

THESIS

MUNICH

1966

ÜBER PROTEASE-INHIBITOREN IM PANKREAS
VERSCHIEDENER SÄUGETIERE UNTER BESONDERER
BERÜCKSICHTIGUNG DER CHYMOTRYPSIN-INKTIVIERUNG.

Friedhelm Woitinas

München

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem klinisch chemischen Institut an der
chirurgischen Klinik der
Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. E. Werle

ÜBER PROTEASE-INHIBITOREN IM PANKREAS VERSCHIE-
DENER SÄUGETIERE UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTI-
GUNG DER CHYMOTRYPSIN-INKTIVIERUNG.

Über einen zweiten Trypsin-Inhibitor im Rinder-
pankreas und einen Chymotrypsin-Inhibitor aus
dem Serum.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig - Maximilians - Universität zu
München
vorgelegt von

Friedhelm Woitinas

München, April 1966

Referent: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Dekan: Prof. Dr. R. Zenker

Tag der mündlichen Prüfung: 21.6.1966

Dem Leiter des Instituts, Herrn Prof. Dr.Dr. E. Werle,
danke ich für die Überlassung des Themas und der zur
Durchführung der Arbeit erforderlichen Mittel und Ein-
richtungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Fritz für
wichtige Anregungen und Hinweise.

Den technischen Assistenten des Instituts danke ich
für ihre freundliche Unterstützung.

Inhalt

I

- A. Einleitung
- B. Isolierung und Eigenschaften wichtiger Inaktivatoren
- C. Natürliche Inaktivatoren und einige Aspekte der Chymotrypsinwirkung

II

Eigene Untersuchungen.

- A. Bestimmungsmethoden für Chymotrypsin und seine Inaktivierung
 - a) Indirekte Bestimmungen
 - b) Direkte Bestimmungen
 - c) Eine neue Esterolysebestimmung
 - d) Direkte Bestimmung des Chymotrypsins mit N-Succinyl-phenylalanin-p-nitroanilid
- B. Untersuchungen mit dem Kallikrein-Inaktivator aus Rinderorganen und dem Kunitz'schen Pankreas-Inaktivator.
 - a) Der Inaktivatorgehalt für Chymotrypsin bzw. Trypsin und Kallikrein im Pankreashomogenat und -Extrakt von Mensch, Schwein, Hund und Kaninchen.
 - b) Die Verhältnisse im Rinderpankreas
- C. Säulenchromatographische Trennung des Kunitz'schen Pankreas-Kallikrein-Inaktivators von einem spezifischen Trypsin-Inaktivator
- D. Untersuchung des Pankreassekretes von Mensch, Hund und Jungrind
- E. Bestimmung der Chymotrypsin-Inaktivierung durch einen spezifischen Inhibitor aus der α_1 -Globulinfraktion menschlichen Serums mit dem Substrat SUPHEPA.

III

Diskussion

IV

Zusammenfassung

V

Anhang

VI

Literaturnachweis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.

A^{LD}H = Alkoholdehydrogenase

DPN = Diphosphopyridinnucleotid

BAPA = N-Benzoyl-arginin-p-nitroanilid

BAEE = N-Benzoyl-arginin-aethylester

CIE = Chymotrypsin-Inaktivator-Einheiten

KI = Kallikrein-Inaktivator "Trasylol"

KIE = " " -Einheiten

IEP = Isoelektrischer Punkt

PKI = Pankreas-Kallikrein-Inaktivator = Kunitz'scher
Inaktivator

SPI = Schweinepankreas-Inaktivator

SBPHEPA = N-Succinyl-phenylalanin-p-nitroanilid

TEE = Tyrosinaethylester

TCE = Trichloressigsäure

TI = Spezifischer Trypsin-Inaktivator

TIE = Trypsin-Inaktivator-Einheiten

TRIS-Puffer = Trihydroxy-methyl-aminomethan

TRAP- " = Triäthanol-amin-pyrophosphat

I

A. EINLEITUNG.

Die entzündlichen und nekrotisierenden Affektionen des Pankreas gehören zu den Erkrankungen, über deren Genese und Verlauf noch kein einheitliches Bild besteht. Aus der klinischen Erfahrung heraus ergeben sich vier Affektgruppen, die zu einem entzündlichen Geschehen im Pankreas führen können (nach W. Hess). ¹⁾

1. Infektiös-toxische Einflüsse in Verbindung mit einer akuten oder chronischen Cholecystitis.
2. Stauung des Pankreassaftes bei entzündlicher Papillenstenose, Verschlußstein der Papilla Vateri, Tumor und Ascarisinvasion im Bereiche des Ductus pankreaticus.
3. Virusinfektionen bei Mumps und Hepatitis epidemica.
4. Circulationsstörungen bei Arteriosklerose, cardialer Stauung, Thrombosen, neurovegetativen und allergischen Durchblutungsstörungen.

Angeichts des charakteristischen und oft fulminanten Verlaufs einer akuten Pankreatitis musste jedoch an ein für das Pankreas spezifisches Ereignis gedacht werden. Schon Chiari vermutete, daß es zu einer Fermententgleisung in der Drüse komme: ¹⁾der erhöhte Diastasespiegel im Blut während eines akuten Anfalls wird auch heute noch zu diagnostischen Zwecken herangezogen. ²⁾

Die bei operativen Eingriffen oft gefundenen Fettgewebsnekrosen im Pankreasbereich können durch die Annahme einer pathologischen Lipasefreisetzung hinreichend erklärt werden. Jahre

danach werden röntgenologisch oft Kalkschatten nachweisbar. Für einen Defekt im Zellverband wurde vor allem das Trypsin verantwortlich gemacht. 3, 4, 5, 6,) Da es nicht nur selbst zu einer relativ raschen Zerlegung bestimmter Peptidketten fähig ist, sondern auch andere Zymogene (die inaktiven Vorstufen von Pankreasproteasen) aktiviert, kann es eine beträchtliche Proteolyse auslösen. Eine hämorrhagische Pankreasnekrose würde nach diesen Vorstellungen die Auswirkung einer solchen Fermententgleisung sein. 3)

Frey, Kraut und Werle entdeckten 1930 im Pankreas das Kallikrein, welches ebenfalls durch Trypsin aus seiner inaktiven Vorstufe, dem Kallikreinogen, aktiviert wird. Es hat wie das Trypsin die Fähigkeit, im Blut gefäßaktive Polypeptide, die Kinine, freizusetzen. Für diese Protease wurde kurze Zeit später von den gleichen Autoren ein Hemmkörper beschrieben. 7,8) Dieser Inaktivator ist ein höhermolekulares Polypeptid, das unter dem Firmennamen "Trasylol" (Bayer-Werke) immer wachsende Bedeutung erlangt hat. Es wurde anfangs aus Rinderparotis gewonnen und hemmt außer Kallikrein auch Trypsin, Chymotrypsin und Fibrinolysin. 9, 10) Es lag nahe, den Kallikrein-Inaktivator auf Grund dieser Eigenschaften für die Therapie der Pankreatitis einzusetzen. 11, 12, 13) Seine Wirksamkeit wurde aus der klinischen Beobachtung heraus immer wieder bestätigt. 14, 15, 16, 17)

Die Untersuchungen von tierexperimentell erzeugten Pankreatitiden brachten jedoch widersprechende Ergebnisse. Vor allem über die Rolle des Trypsins bei einer unphysiologischen Fermentaktivierung besteht noch keine Klarheit. Neben diesem wur-

den auch die Carboxypeptidase, die Kollagenase, eine Pankreaselastase und Kathepsine als wichtige Faktoren einer Fermententgleisung beschrieben. 18, 19, 20, 21, 22, 23)

Experimente, in denen durch Malonat die Zellatmung blockiert wurde, machten wahrscheinlich, daß diese Stoffwechselschädigung der Zelle deren Struktur für den Angriff von proteolytischen Enzymen empfindlich macht. 24, 25)

1936 isolierten Kunitz und Northrop aus dem Pankreas des Rindes einen weiteren Inaktivator, der dem Kallikrein-Inaktivator ähnliche Eigenschaften aufweist. 26) Einen Inaktivator, der nur das Trypsin nimmt, stellte 1948 Kazal dar²⁷⁾.

Seine Isolierung aus dem Rinderpankreas gelang allerdings nur in äußerst geringen Mengen. Aus Hundepankreas und Pankreassekret von Ratten konnten Inaktivatoren angereichert werden, die ebenfalls nur das Trypsin hemmten. 28, 29)

Im Pankreas des Kaninchens wurde ein Hemmkörper festgestellt, der dem Kunitz'schen ähnelt. 30)

Dadurch, daß im Pankreas des Rindes ein dem Kallikrein-Inaktivator entsprechender gefunden wurde, erschien die Therapie der Pankreatitis mit "Trasylol" um so sinnvoller.

Die organspezifische Wirkung sah man in einem zusätzlichen Schutz vor einer unphysiologischen Aktivierung der durch den Kallikrein-Inaktivator hemmbaren Enzyme 31, 19), soweit diese nicht mit dem organeigenen Inaktivator bereits einen inaktiven Komplex gebildet hatten. Denn die Tatsache, daß in keinem Falle aktives Trypsin nachweisbar wurde schloß nicht aus, daß kleinste Mengen Trypsin gleichzeitig vorhandene Zymogene zu aktivieren vermögen, bevor sie abgefangen

werden. ⁵⁸⁾ Diese Vorstellungen wurden indessen verlassen, da dem Inaktivator sowohl im Pankreassaft als auch im -Gewebe das drei- bis zehnfache an aktivierbarem Enzym gegenübersteht. ^{33, 34)}

Über die Physiologie der Pankreas-Inaktivatoren kann nur diskutiert werden. Kraut et al. zeigten, daß der Kallikrein-Inaktivator und der Kunitz'sche Pankreas-Inaktivator nicht nur Ähnlichkeit besitzen, sondern nach ihrem biochemischen und physikalischen Verhalten identisch sein dürften. ⁹⁾

Der Kallikrein-Inaktivator wurde von Werle et al. auch in anderen Organen des Rindes, so in der Leber und in der Lunge, aufgefunden. ³⁵⁾ Weitere Protease-Inaktivatoren wurden in

mehreren Fraktionen des Serumeiweißes von Warm- und Kaltblütern und im Urin des Menschen aufgefunden. ^{32, 36, 37, 38)}

In tierischen Produkten wie etwa dem Colostrum des Rindes ³⁹⁾ und in Extrakten aus *Ascaris* ⁴⁰⁾ wurden weitere Hemmstoffe

gefunden. Eine Reihe von ähnlichen Inhibitoren, Mucoproteiden, stammt aus dem Eiklar der Vogeleier. ⁴¹⁾ Ein solcher

"Ovomucoidinhibitor" wurde auch rein, jedoch nicht kristallisiert dargestellt. ⁴²⁾ Protease-Inhibitoren sind aber nicht

nur im Tierreich weit verbreitet, es gibt auch eine Viel-

zahl von Inhibitoren, die aus pflanzlichem Material iso-

liert oder angereichert werden konnten. Am längsten be-

kannt und weitgehend charakterisiert ist der ebenfalls von

Kunitz bereits kristallisierte Inaktivator aus der Sojabohne.

Er hat ähnliche Eigenschaften wie der Pankreas-Inaktivator des Rindes. ³⁹⁾

Tabelle I: Einige Proteaseinhibitoren tierischen und pflanzlichen Ursprungs.

Inaktivator aus (von)	Inaktivator für	Verhalten in 5% TCE bei 60°	Abbau d. Trypsin	Abbau d. Pepsin ⁽⁴⁴⁾	Molekulargewicht
Rinderpankreas (Kunitz)	Trypsin Chymotryp. Kallikrein Plasmin	stabil	-	-	niedrig (6 500)
Rinderorganen "Trasylol"	" " " Elastase ⁴⁵⁾	"	"	"	"
Rinderpankreas (Kazal)	Trypsin Plasmin	labil	+	++	niedrig
Rinderpankreas ⁴⁶⁾	Elastoproteinase Elastomucase				
Hühnerei "Ovomucoid"	Trypsin	labil	+	++	niedrig
Hundepankreas	Trypsin	stabil	+		niedrig
Pankreasgang des Menschen ⁴³⁾	Trypsin	stabil	+		niedrig
Blutplasma des Menschen	Trypsin Kallikrein, Chymotrypsin Plasmin	sehr labil		+++	hochmolekular (über 50 000)
Harn des Menschen	Kallikrein Trypsin				Hochmolekular
Rindercolostrum	Trypsin Chymotryp.	stabil	-	+	niedrig
Ascaris	Chymotrypsin, (Kallikrein, Trypsin)	stabil	-	-	niedrig
Sojabohne	Tryps., Chymotryps., Kallikr., Plasmin, Elastase ⁴⁷⁾	reversibel denaturierbar	-	++	niedrig
Kartoffel	Chymotryp. (Tryp./Kall.)	stabil			niedrig

B. Isolierung und Eigenschaften wichtiger Inaktivatoren.

Der Pankreas-Inaktivator von Kunitz und Northrop wurde angereichert, indem zunächst Trypsinogen entfernt wurde und dann der Pankreasextrakt fraktioniert bei pH 3 und pH 5 mit Magnesiumsulfat ausgefällt und dann auf 80° anschließend erhitzt wurde, um die restlichen Enzymvorstufen zu zerstören. Die Ausbeute betrug etwa 1 mg kristallisierter Inaktivator / kg Pankreas.²⁶⁾ Green und Work verwendeten die Rückstände aus der Insulingewinnung und setzten zum Fällen ebenfalls Ammoniumsulfat ein. Sie kristallisierten zunächst den Trypsininhibitor-Trypsin-Komplex. Dieser wurde durch Trichloressigsäure getrennt und anschließend wurde der Inaktivator durch Ausfällen in Ammoniumsulfat kristallisiert.³⁹⁾ Er wurde von anderen Autoren auch säulenchromatographisch gereinigt und ist in seiner Aminosäurezusammensetzung und -Sequenz seit kurzem bekannt.⁴³⁾

Kazal fällte nach Abtrennen der Insulinfraction mit 31%iger NaCl-Lösung fraktioniert mit Äthanol. Die Kristallisation erfolgte aus 2,5%iger Trichloressigsäurelösung bei 5°. Seine Ausbeute betrug durchschnittlich 75 µg / kg gefrorenes Pankreasgewebe.²⁷⁾ Dieser Trypsin-Inaktivator unterschied sich vom Kunitz'schen Pankreas-Inaktivator: ein Trypsin-Trypsininaktivator-Komplex konnte nicht dargestellt werden. Er hemmte außer Trypsin nur noch Fibrinolysin. Er ist nicht dialysierbar, wird durch 5%ige Trichloressigsäure ausgefällt. (nicht durch 2,5%ige), wird von Trypsin und Pepsin angegriffen und zeigt elektrophoretisch drei wirksame Komponenten.²⁷⁾

Gleichfalls einem Abbau durch Trypsin unterliegt der Ovomucoid-Inhibitor. Da sich dies in einer Abnahme der Hemmwirkung äußert, wurde es als temporäre, d. h. vorübergehende Inaktivierung bezeichnet.³⁹⁾

Der Sojabohnen-Inhibitor wurde entsprechend dem zur Isolierung des Pankreas-Inaktivators angewandten Verfahren und von anderen Autoren säulenchromatographisch gereinigt. Seine Hemmeigenschaften ähneln denen des Pankreas-Inaktivators.

Für diesen und den Kallikrein-Inaktivator wurde eine Blockierung des aktiven Zentrums am Enzym diskutiert. Der Sojabohnen-Inhibitor zeichnet sich dadurch aus, daß er reversibel denaturierbar ist. ³⁹⁾

Tabelle II:Wichtige Peptidasen des Pankreas.

	Vorstufe	Aktiviert durch	Natürliches Substrat
Trypsin	- ogen	Enterokinase (d.Darmschleimhaut) Trypsin (Ca^{++}) Kathepsin 47)	Peptidbindung basischer Aminosäuren
Chymotrypsin	- ogen	Trypsin	Vorzugsweise Peptidbindung aromatischer Aminosäuren (Tyrosin, Phenylalanin)
Kallikrein	- ogen	Trypsin	Kininogen (Kallidinogen)
Carboxypeptidase	Pro -	Trypsin	Carboxylende einer Peptidkette
Elastase	Pro -	(Trypsin)	Elastin . Peptidbindung neutraler Aminosäuren.

C. Natürliche Inaktivatoren und einige Aspekte der Chymotrypsinwirkung.

Die beim Trypsin heute in großen Zügen überschaubaren Verhältnisse bezüglich seines Verhaltens gegenüber natürlichen Inaktivatoren - es bildet sich meist ein stöchiometrischer Komplex - scheinen beim Chymotrypsin unterschiedlich und komplizierter zu sein.

Nach Wu und Laskowski ⁴⁸⁾ bildet keiner der natürlichen Inhibitoren einen stöchiometrischen Komplex mit Chymotrypsin

(α oder β).

Für den Pankreas-Inaktivator von Kunitz fanden sie ein nahezu lineares Hemmverhältnis, wenn 30 bis 60 µg Chymotrypsin mit steigenden Mengen Inaktivator versetzt werden. Geringe Mengen Sojabohnen-Inhibitor pro Ansatz vermochten mehr als ein Mol Chymotrypsin / Mol Sojabohnen-Inhibitor zu hemmen. Die beiden temporären Trypsin-Inaktivatoren, der Kazal'sche aus dem Pankreas und Ovomucoid-Inaktivator vom Huhn hemmen interessanterweise das Chymotrypsin nicht. ³⁹⁾

Aus Kartoffelextrakt wurde vor kurzem ein Chymotrypsin-Inaktivator dargestellt ⁴⁹⁾, nach einem Verfahren ähnlich dem, das von Green und Work zur Darstellung des Pankreas-Inaktivators angewandt wurde. Hier konnte auch der Chymotrypsin-Inaktivator - Chymotrypsin-Komplex erhalten werden. Der Inhibitor hemmt außer der Proteolyse und der Esterolyse des Chymotrypsins in geringem Maße auch die casein-verdauende, aber nicht die esterolytische Wirkung des Trypsins.

Ein Chymotrypsin-Inhibitor wurde säulenchromatographisch aus Ascarisextrakten gewonnen. ⁵⁰⁾ Seine Trennung von der trypsinhemmenden Fraktion erfolgte elektrophoretisch; die spezifische Hemmaktivität konnte dadurch auf das 100-fache gesteigert werden. Er bildete mit dem Chymotrypsin zwischen pH 5 und 7 einen stabilen Komplex.

Es existieren also Inhibitoren die, obwohl sie zunächst als ein polyvalenter Hemmkörper erscheinen, sich durch bestimmte Methoden in Einzelkomponenten auftrennen lassen und das Chymotrypsin spezifisch hemmen. Die Auftrennung

gelang beim Ascarisinhibitor auf Grund von Ladungsunterschieden der Einzelfractionen. Ihr Molekulargewicht liegt offenbar nahe beieinander.

Ob auch im hochentwickelten Säugetierorganismus spezifisch Chymotrypsin-Inhibitoren vorkommen, ist bisher nicht sicher geklärt. Über die Zusammenhänge von Proteasen im Blut und ihren Inhibitoren bestehen ebenfalls noch keine klaren Vorstellungen. Wie eingangs erwähnt, werden ins Blut übergetretene Pankreasproteasen für die Auslösung allgemeiner Krankheitssymptome bei der Pankreatitis mit verantwortlich gemacht.

Austen et al. glauben bewiesen zu haben, daß das Chymotrypsin als aktivierte Zellproteinase die Freisetzung von Histamin und somit generell die Entstehung von Schock- und Allergiezuständen mit verursacht.⁵¹⁾ Oswald sah eine Bestätigung dieser Ansicht in der günstigen klinischen Wirksamkeit der ϵ -Aminocaprinsäure, einem Pharmakon, das zur Ergänzung und Potenzierung der Kallikrein-Inaktivatorwirkung klinisch herangezogen wird.⁵²⁾

Französische Autoren beschrieben jedoch inzwischen eine Unwirksamkeit der ϵ -Aminocaprinsäure als Proteasehemmer in vitro, vermochten aber die Plasminogenaktivierung im Plasma zu hemmen.⁵³⁾

II

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Da der Trypsin-Chymotrypsin-Kallikrein-Inaktivator, das sogenannte "Trasylol", bei der Behandlung der Pankreatitis gute klinische Ergebnisse zeigte und er andererseits mit dem Kunitz'schen Pankreas-Inhibitor des Rindes identisch zu sein scheint, sollte versucht werden, im Rahmen dieser Arbeit zu klären, ob er einen physiologischen Schutz gegen die aktiv werdenden Enzyme des Pankreas darstellt. Es war zunächst nachzuweisen, in wieweit der Kunitz'sche Inhibitor auch bei anderen Säugetieren und beim Menschen vorkommt. Es wurde die Hemmfähigkeit von Gewebsextrakten und Sekreten gegenüber Chymotrypsin, Trypsin und Kallikrein eingehend untersucht.

Um zu zuverlässigen Ergebnissen zu kommen war es jedoch nötig, zunächst Methoden auszuarbeiten, die es gestatten, nicht nur Trypsin und Kallikrein sondern vor allem auch das Chymotrypsin und seine Inaktivierung in rohen Gewebsextrakten und Pankreassekreten sicher und reproduzierbar zu bestimmen. Es sollte festgestellt werden, welche bisher beschriebenen, in Frage kommenden Bestimmungsverfahren in Gegenwart von viel Fremdeiweiß und Enzymkörpern anzuwenden, bzw. nicht brauchbar sind.

A. Bestimmungsmethoden des Chymotrypsins und seiner Inaktivierung

Die Methoden, mit denen sich quantitative Messungen des Chymotrypsins durchführen lassen, gliedern sich in kinetische und akinetische, in direkte und indirekte. Letztere können mit natürlichen und synthetischen Substraten durchgeführt werden. Da das Chymotrypsin nicht nur als Peptidase sondern auch als Esterase zu wirken vermag, können für die kinetischen Bestimmungen einerseits Substrate verwandt werden, bei denen eine Esterbindung, andererseits solche, bei denen eine Peptid -, bzw. Amidbindung gelöst wird. Akinetisch wird eine Chymotrypsinmenge nach ihrer Molarität, kinetisch nach dem Maß ihrer enzymatischen Hydrolyse (Aktivität) bestimmt. Erstere Enzymbestimmung kann mit synthetischen Inhibitoren durchgeführt werden. Ein für Chymotrypsin fast spezifischer Hemmstoff wurde vor kurzem in dem 2-Nitro-4-carboxyphenyl-N'-N-diphenylcarbamat beschrieben. Er reagiert stöchiometrisch mit Chymotrypsin, wobei eine äquimolare Menge 5-Nitro-4-hydroxybenzoesäure gebildet wird, deren gelbe Farbe colorimetrisch bei einer Wellenlänge von 405 m μ direkt abgelesen werden kann.⁵⁴⁾ Die Fehlermöglichkeiten einer solchen Bestimmung sind zwar gering, und Verunreinigungen, etwa Begleitproteine, wirken sich nicht störend aus, jedoch muß eine Inkubation über 45 Min. bei 37° C erfolgen, da die Reaktion langsam erfolgt und erst über diesen Zeitraum reproduzierbar verläuft. Bemerkenswert ist, daß die Bestimmung relativ pH-un-

abhängig erfolgt und kein organisches Lösungsmittel verlangt. Ein ähnliches Verfahren wurde mit Trans-cinnamoylimidazol angegeben. ⁵⁵⁾

Diese akinetischen, direkten Titrationsen des Chymotrypsins dürften nur in besonderen Fällen zur Anwendung gelangen. Das CPD hat als spezifischer Inaktivator zur Reinheitsprüfung eine wesentlichere Bedeutung.

Zu den meistgebrauchten kinetischen Bestimmungen gehören die mit natürlichen Substraten, obwohl diese wegen ihrer Unspezifität nur für reine Enzyme in Frage kommen. Ebenso wie das Trypsin greift auch das Chymotrypsin denaturierte, in ihrer Tertiärstruktur veränderte Peptidketten an und setzt dabei bestimmte Aminosäuren frei, die dann mit einem chromogenen Entwickler gekuppelt werden können. Zum summarischen Erfassen von proteolytischen Aktivitäten verschiedener, gleichzeitig vorliegender Enzyme, wird meist der sogenannte Ansonstest benützt, und als Substrat gekochtes Casein verwandt. ⁵⁶⁾ Bei einer Bestimmung der Inaktivierung reiner, vorgegebener Enzyme werden die Konzentrationsverhältnisse so gewählt, daß ein bestimmter Anteil wirksam, also in seiner Aktivität messbar bleibt. Es wird also immer die Menge nicht gehemmtes Enzym bestimmt und durch Vergleich mit Parallelansätzen, in denen der Inaktivator fehlt, das Maß der Hemmung errechnet. Die vorgegebenen Enzymmengen betragen zwischen 5 und 20 μg , die Inaktivierung wird durch eine 50%ige Aktivitätsminderung bestimmt, da sie so am besten vergleichbar ist. Um einen

Inaktivator möglichst unverändert und nativ zu bestimmen ist es nötig, ihn auch im wässrigen Homogenat zu erfassen, das immer einen hohen Proteingehalt aufweist, unter Umständen aktive, sicher aber aktivierbare Enzyme und andere Begleitstoffe enthält. Ferner ist es wichtig, daß die mit enteiweißten Extrakten erhaltenen Ergebnisse mit den Verhältnissen im wässrigen Homogenat verglichen und in Beziehung gesetzt werden können. Die Fragen, ob es hochmolekulare Inhibitoren gibt, die sich der Extraktion entziehen, bzw. durch Säure zerstört werden, oder ob niedermolekulare durch diese erst entwickelt werden, können dann erst geklärt werden.

a) Indirekte Bestimmungen.

Soweit es sich um bekannte Methoden handelt, soll ihre Anwendbarkeit hier nur kurz abgehandelt werden. Die Testbedingungen werden im Anhang wiedergegeben.

Bestimmung mit Harnstoff-denaturiertem Haemoglobin.⁵⁷⁾

Außer dem Casein ist auch das Haemoglobin ein geeignetes, natürliches Substrat, da es reichlich Tyrosin enthält. Wird dieses durch eine Endopeptidase freigelegt - hier durch Chymotrypsin - kann es mit einem Azofarbstoff (Phenolreagenz nach Folin und Ciocalteu) gekuppelt und colorimetrisch bestimmt werden. Die vorangegangene Denaturierung des Haemoglobins mit Harnstoff erleichtert die enzymatische Hydrolyse wesentlich.

Das Verfahren ist für eine reine Chymotrypsinbestimmung zuverlässig. Es liefert auch für 1 μg Enzym noch reproduzierbare Werte. Die Messgenauigkeit beträgt etwa $\pm 5\%$. Die Messwerte steigen proportional zur Enzymmenge bis 30 μg , streuen im Bereich von 30 bis 50 μg jedoch zunehmend. Diese Methode zeigt bereits den Nachteil einer indirekten, kinetischen Messung: die Schritte bis zur meßbaren Farbreaktion stellen vermehrte Fehlerquellen dar. Die Inkubationszeit von 30-40 Min. bei 37° bietet die Möglichkeit für Interferenzen zwischen nachlassender Enzymaktivität, sinkender Substratkonzentration, der Stabilität eines etwa vorhandenen Inaktivators und störenden Begleitproteinen eines Pankreasextraktes. Die Inkubation eines wässrigen Nativhomogenats kommt wegen der Aktivierung anderer Proteinase nicht in Betracht. Es hat sich als günstig erwiesen, nicht mehr wie 20 μg Chymotrypsin vorzulegen, da dann diese Fehlerquellen am wenigsten zur Wirkung kommen.

Bei Versuchen mit einteilweißen Homogenaten wurden Ergebnisse erhalten, die denen mit dem neuen Substrat SUPHEPA (s. u.) ermittelten entsprachen.

N-Benzoyl-L-phenylalanin- β -naphtylester als Substrat.⁵⁸⁾

Dieses Substrat liegt einer indirekten Meßmethode zugrunde, durch die die esterolytische Aktivität des Chymotrypsins gemessen wird. Das Enzym setzt β -Naphtol frei, das mit Echtblausalz wiederum einen Azofarbstoff bildet. Die Hydro-

lyse des Substrates erfolgt so rasch, daß die Inkubation bei 4° erfolgen muß. In dem angegebenen Bereich von 0,5 - 7 µg / Ansatz sind die Messungen reproduzierbar und zeigen einen linearen Verlauf. Die Methode hat jedoch einige Nachteile, die sich vor allem beim Arbeiten mit eiweißhaltigen Extrakten bemerkbar machen. Die Substratlösung war so labil, daß sie in Abhängigkeit von der Eiweißkonzentration zu einer vermehrten Trübung der Inkubationsflüssigkeit führte. Auch mit TRIS- und TRAP- Puffer konnte keine bessere Löslichkeit des Substrates erzielt werden. Die Spezifität des Substrates war in Gegenwart von Pankreasextrakten nicht gewährleistet.

Diese zusätzlichen Mängel dürften die widersprüchlichen Ergebnisse erklären, die hier bei Untersuchungen von Pankreasextrakten auf ihren Inaktivatorengehalt gefunden wurden.

Schön et al. ⁵⁹⁾ kritisieren an dieser Methode vor allem, daß sich einmal aus den Versuchsbedingungen kein günstiger Meßbereich für Inaktivatorbestimmungen ergibt, zum anderen, daß bei einer so niedrigen Enzymkonzentration Störungen durch Oberflächenadsorption auftreten. Sie verwandten deshalb den β -Phenylpropionsäure- β -naphthylester und beschrieben diesen als ein relativ spezifisches Substrat für Chymotrypsin, wenn auch die Esterolyse nicht so charakteristisch sei.

Einen Inaktivator für Chymotrypsin in Pankreasextrakten zu erfassen dürfte obige Bestimmung nicht geeignet sein. Dies gilt noch mehr für den besser wasserlöslichen N-Acetylphenylalanin- β -naphthylester. Die enzymatische Hydrolyse erfolgt hier langsamer, jedoch die Spontanhydrolyse vermehrt. Daraus ergeben sich weitere Fehlermöglichkeiten.

Enzymatische Hydrolyse durch Chymotrypsin (58).

V e r b i n d u n g	opt. Form	Chymotryp- sin	Carboxy- peptid.	Tryp-Pep-Este-Li sin sin rase pase
N-Acetyl-phenylala- nin-β-naphtylester	DL	12,5 ⁺⁾	0	1,5 0 0,44 0
N-Benzoyl-phenyl- alanin-β-naphtylest.	DL	58,4	0	6,6 0 0,18 0

⁺⁾ : Die Zahlen sind ein Maß für die Affinität des Enzyms zum entsprechenden Substrat.

Über eine weitere, neue, indirekte Bestimmungsmethode wird an anderer Stelle berichtet (s. u.).

b) Direkte Bestimmungen

Diese haben gemeinsam, daß ein Reaktionsprodukt der enzymatischen Hydrolyse direkt quantitativ bestimmt werden kann. Die Freisetzung von Fluorescein aus einer entsprechenden Fluoresceinesterverbindung kann direkt verfolgt werden.⁶⁰⁾ Jedoch ist diese Bestimmungsmethode zu unempfindlich und an eine besondere Laborausrüstung gebunden. Nitroaromatischen Verbindungen entspricht eine Gelbfärbung, deren Zunahme bei 405 mμ direkt verfolgt werden kann. (p-Nitrophenol, p-Nitroanilin).

N-Carbobenzoxyl-L-Tyrosin-p-nitrophenylester. ⁶¹⁾

Die hervorstechenden Eigenschaften dieses Substrates sind

seine außerordentliche Empfindlichkeit einerseits, seine mangelnde Spezifität andererseits. Nach den Angaben der Autoren ist eine $2,5 \times 10^{-5}$ m wässrige Lösung möglich. In höherer Konzentration löst sich das Substrat nur in methanolischem oder acetonischem Milieu, zeigt dann aber eine beträchtliche Spontanhydrolyse. Obgleich von den Verfassern als Lösungsmittelzusatz Methanol angegeben ist, war das Substrat in acetonischer Lösung stabiler und die Meßwerte besser reproduzierbar. Die extreme Empfindlichkeit dieser Bestimmung ist für Inaktivatormessungen nicht geeignet. (Meßbereich: 10 - 50 μ mg).

Nativer Hundepankreassaft zeigte eine hohe esterolytische Aktivität, die sich durch Enteiweißen lediglich vermindern, jedoch nicht beseitigen ließ. Es dürfte sich dabei um Esterasen gehandelt haben. Die Methode erschien von allen getesteten am wenigsten spezifisch.

L-Tyrosinäthylester = TEE ⁶²⁾

Die Chymotrypsinbestimmung mit Hilfe dieses Substrates wird häufig angewandt und entspricht der Messung von Trypsin und Kallikrein mit Benzoyl - argininäthylester (BAEE). Da der Ester anders absorbiert, als das L-Tyrosin, kann aus der Extinktionsabnahme bei 234 m μ das Maß der Freisetzung von L-Tyrosin bestimmt werden. So gut sich dieses Verfahren zur Bestimmung von reinem Chymotrypsin an sich eignet, so unzureichend zeigt es sich, wenn zugleich peptidhaltige,

rohe Perchlorsäureextrakte verwendet werden, da 234 mμ in einem Bereich liegt, in dem Proteine und Peptide stark absorbieren. Sind diese in so hoher Konzentration zugegen, wie es bei der Inaktivatorbestimmung mit enteweißten Pankreasauszügen der Fall ist, wird die Empfindlichkeit der Messung so beeinträchtigt, daß gegenüber dem extraktfreien Vergleichswert die Ablesebedingungen sehr verändert werden müssen: Am Zeissphotometer müssen die äußersten Empfindlichkeitsstufen eingeschaltet werden. Weitere Zweifel an der Zuverlässigkeit der Methode unter den hier gegebenen Bedingungen stellten sich ein, als ein in HCl gekochter und dann enteweißter Caseinextrakt, der auf diese Weise nur noch Peptide enthielt, eine "Hemmwirkung" ergab. Ein solcher Effekt ist sicher nicht spezifisch, muß aber nicht auf rein methodischen Fehlern beruhen: der Kallikrein-Inaktivator (Trasylol) hemmt die Esterolyse des Chymotrypsins etwa vier mal so stark wie die Proteolyse. Dies wurde einerseits mit dem hier zur Diskussion stehenden Verfahren, andererseits in Übereinstimmung zu dem von Kraut et al. für die Caseinverdauung angegebenen Wert mit dem neuen Substrat SUPHEPA (s. u.) ermittelt. Da der fast reine Inaktivator verwandt wurde, bestehen in diesem Fall hinsichtlich der Methode keine Bedenken. (Abb. 7).

c) Eine neue, indirekte Bestimmung der Esterolyse.

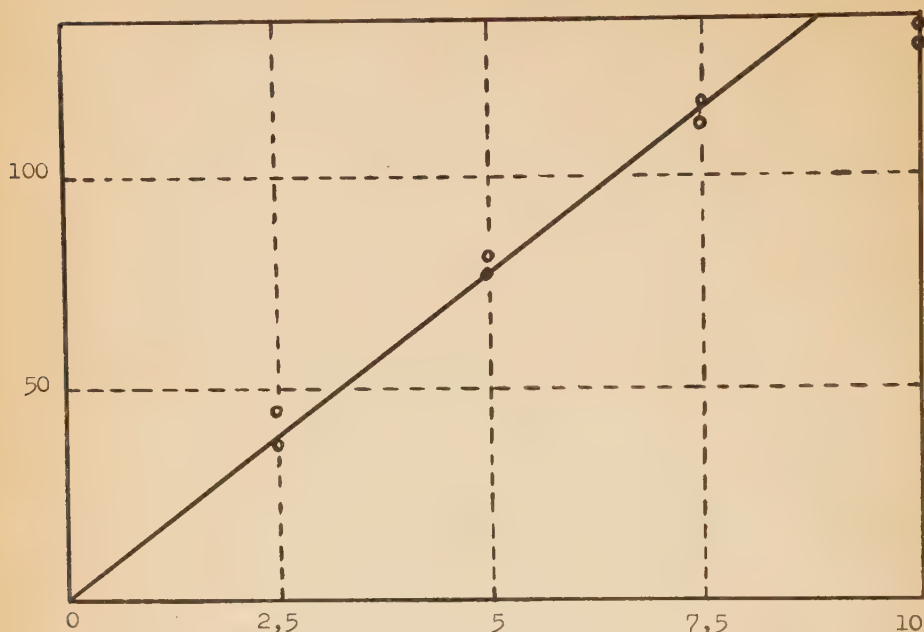
Diese Methode stellt eine Modifikation der von Traut-schold und Werle ⁶³⁾ für die Bestimmung des Kallikreins mit dem erwähnten Benzoyl-argininäthylester beschriebenen dar.

Das durch Chymotrypsin aus dem L-Tyrosinäthylester freigesetzte Äthanol wird in Gegenwart von Alkoholdehydrogenase (ADH) dehydriert. Dabei geht das Coenzym DPN in $DPNH + H^+$ über, was durch Absorptionsmessung bei 366 mμ verfolgt werden kann.

Diese Bestimmung hat den Vorteil, daß sie auch mit proteinhaltigen Lösungen durchzuführen ist, sie zeigt jedoch Nachteile einer indirekten Methode: soll eine Proportionalität zwischen der Extinktionszunahme pro Zeiteinheit und der Chymotrypsinkonzentration bestehen, darf die Umsetzung des DPN nicht geschwindigkeitsbegrenzend sein. Dies dürfte über 7 μg Enzym pro Ansatz nicht mehr der Fall sein, vielmehr wird in diesem Bereich nur das Gleichgewicht verschoben und es ergeben sich keine linearen, wenn auch reproduzierbaren Eichwerte. Bei Bestimmungen unter 1 μg pro Ansatz ist die Streuung der Meßwerte zu groß. In den ersten 10 Minuten findet eine sprunghafte, nicht linear verlaufende Spontanhydrolyse statt, die störend sein kann und deshalb abgewartet werden muß.

Obwohl die Methode handlich und in mancher Hinsicht vorteilhaft ist, wurde sie hier nicht weiter verwandt, da durch sie nur die Esterolyse des Chymotrypsins erfaßt wird.

Abb.1: Bestimmung von Chymotrypsin mit Tyrosinäthylester u. ADH.



25°, Wellenlänge: 366 mμ. 0,1 m Phosphatpuffer pH = 8,7

Ordinate: Extinktionsdifferenz = $\Delta E \times 10^3 / 15 \text{ Min.}$

Abszisse: μg Chymotrypsin / 3 ml.

Lösungen: 0,1 m Phosphatpuffer, pH = 8,7. L-Tyrosinäthylesterhydrochlorid, 0,002 m in Puffer gelöst. 15 mg DPN / ml Aqua bidest., ADH aus der Ampulle (Boehringer). Chymotrypsin in 0,0025 n HCl-Lösung.

Gemessen wird bei 25° und einer Wellenlänge von 366 mμ mit 1 cm Glasküvetten.

Ansätze: Puffer, Inaktivator und Chymotrypsinlösung werden ad 2 ml in einem Reagenzglas vorinkubiert (entfällt bei Eichwerten). Nach 5 Min. werden 0,6 ml entnommen und in eine Küvette pipettiert. Dort wird folgendes in definierter Reihenfolge hinzugefügt: 0,28 ml Puffer (0,88 ml für den Leeransatz zur Bestimmung der Spontanhydrolyse), 0,1 ml DPN, 0,02 ml ADH und

2 ml TEE-Lösung. Nach sorgfältigem Mischen wird 5 Min. gewartet und anschließend die Extinktionsdifferenz über 15 Min. bestimmt. Die in der gleichen Zeit erfolgte Spontanverseifung wird berücksichtigt. Abgelesen wird gegen Puffer oder gegen Luft. Die Leerprobe kann auch direkt als 0-Bezugswert verwendet werden.

- d) Chymotrypsinbestimmung auf direktem Weg mit dem neuen Substrat Succinyl-phenyl-alanin-p-nitroanilid = SUPHEPA ⁺⁾

Die seit kurzem bekannten N-Acyl-aminosäure-p-nitroanilide ermöglichen es, die enzymatische Freisetzung von p-Nitroanilin bei einer Wellenlänge von 405 m μ direkt zu verfolgen. Vor allem für Proteasen wie das Chymotrypsin und das Trypsin ist von Substraten, bei denen nicht eine Esterbindung, sondern eine Amidbindung gelöst wird, eine relativ hohe Spezifität zu erwarten.

Von Wiener Autoren wurde als Substrat für das Trypsin das Benzoyl-arginin-p-nitroanilid und für das Chymotrypsin das Acetyl-phenylalanin-p-nitroanilid angegeben.⁶⁴⁾ Für letzteres wurde wegen seiner Schwerlöslichkeit in wässrigem Milieu eine 0,01 m Lösung in Dimethylformamid verwandt. Bis zu einer 2%igen Endkonzentration dieses organischen Lösungsmittels fanden die Autoren bei ihren Versuchsbedingungen keine Minderung der Chymotrypsinaktivität. In ihrem Ansatz, der Puffer vom pH = 8, eine 10⁻⁴ m Substratkonzentration und ein Prozent Dimethylformamid enthielt, erfolgte die Hydrolyse bei 37° zwar vergleichsweise langsam (0,4 μ g p-Nitroanilin / Min./100 μ g Enzym), jedoch mit der Enzymkonzentration linear ansteigend.

+)

Das Substrat wurde von der Firma Boehringer freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Das hier darzustellende neue Verfahren mit dem Succinyl-phenyl-alanin-p-nitroanilid als Substrat erwies sich für unsere Untersuchungen als das geeignetste. Eine Lösung des Substrates in reinem Puffer, deren Konzentration den Erfordernissen der Enzymkinetik genügt hätte, war auch hier nicht ganz zu erreichen. Es wurde deshalb eine acetonische Substratlösung eingesetzt, deren Endkonzentration an Aceton auf die Aktivität des Chymotrypsins nach Inkubation keinen Einfluß hatte.

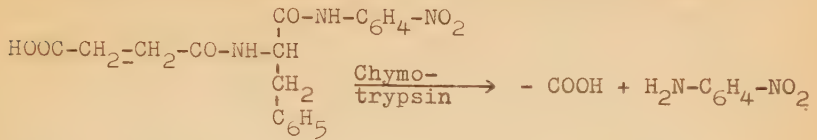
Lösungen: 0,2 m TRIS- oder TRAP-Puffer vom pH 7,8. Der Zusatz von 0,05 m CaCl_2 beeinflusst die Enzymaktivität günstig, wurde jedoch wegen der Bestimmungen mit proteinhaltigen Lösungen nicht verwandt. 0,13 m acetonische Substratlösung : 100 mg Substrat SUPHEPA werden in einem dunklen Fläschchen in 4 ml Aceton gelöst. Mit Puffer pH7,8 wird ad 10 ml versetzt.

Das leicht alkalische pH des Puffers ist für die Löslichkeit des Substrates wesentlich. 10 mg Chymotrypsin (Worthington Biochemical Corporation) werden in 0,05 m CaCl_2 -Puffer gelöst. Die Enzymlösung kann so über 8 Tage bei 4° ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

Chymotrypsinbestimmung ohne Pankreasextrakt:

Puffer und Chymotrypsinlösung werden auf 2,8 ml Küvettenvolumen verteilt und nach Zugabe von 0,2 ml Substratlösung und gutem Mischen wird 5 Min. bei 25° die Startreaktion abgewartet. Darauf folgt das Ablesen der Extinktionsdifferenz bei 405 m μ über 10, 20 oder 30 Min., je nach dem, welche Enzymkonzentration vorliegt oder zu erwarten ist, gegen Luft. Während dieser Zeit muß die Probe bei gleicher Temperatur gehalten werden. Da Nitroaniline gegen UV-Strahlen empfindlich sind, empfiehlt es sich, die Proben im Dunkeln stehen zu lassen.

Abb. 2 : Durch Chymotrypsin katalysierte Umsetzung von SUPHEPA.

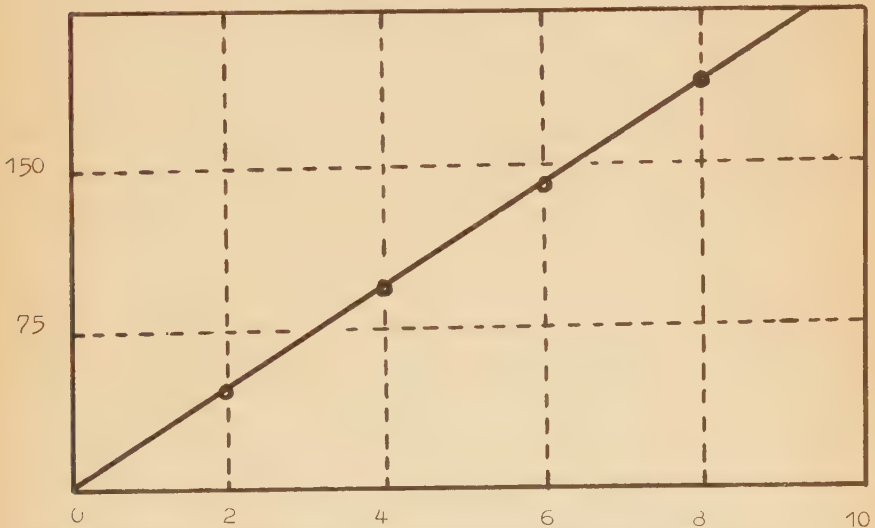


N-Succinyl-phenylalanin-p-nitroanilid (= Carboxy-Propionyl-phenylalanin-p-nitroanilid) = SUPHEPA

→

N-Succinyl-phenylalanin (= Carboxy-Propionyl-phenylalanin)
+ -p-Nitroanilin

Abb.2: Extinktion von p-Nitroanilin.

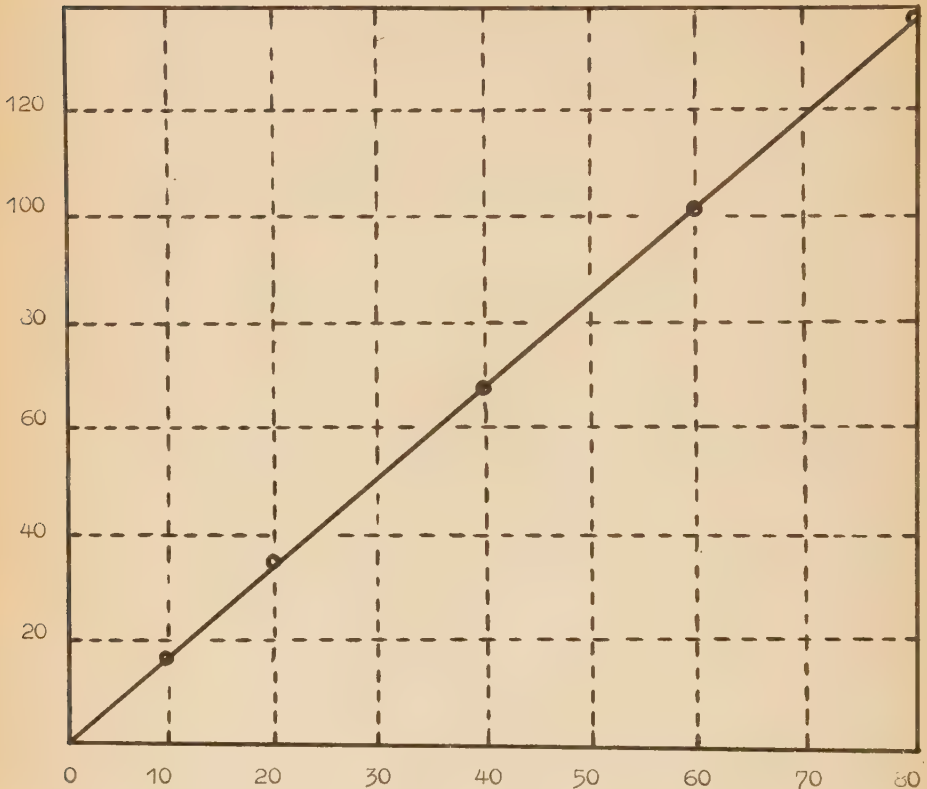


Wellenlänge : 405 mµ . Gemessen gegen 0,2 m TRAP-Puffer

Ordinate : Extinktion x 10⁺³

Abszisse : µg p-Nitroanilin / 3 ml TRAP-Puffer

Abb. 4 : Eichkurve der Spaltung von SUPHEPA durch Chymotrypsin



Temperatur: 25°. Wellenlänge: 405 mμ. 0,2 m TRAP-Puffer, pH=7,8.
Acetongehalt: 2,6 %. CaCl₂-Konzentration : 0,0075 m - 0,03 m .
Substratkonzentration: 2 mg / 3 ml = 1,72 x 10⁻³ m .

Ordinate: $\Delta E / 10 \text{ Min.} = \Delta E \times 10^{+3} / 10 \text{ Min.}$

Abszisse: $\mu\text{g Chymotrypsin} / 3\text{ml}$

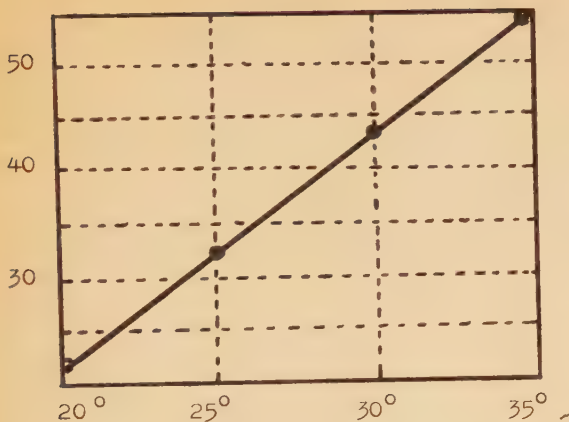


Abb: 5 Hydrolyse von SUPHEPA durch 20 μg Chymotrypsin in Abhängigkeit von der Temperatur.

0,2 m TRAP-Puffer.

0,0075 m CaCl_2 .

Ordinate: $\Delta E \times 10^3 / 10 \text{ Min.}$

Abszisse: Temperatur

Chymotrypsinbestimmung in Gegenwart von Pankreasextrakten,
bezw. Bestimmung der Restaktivität nach teilweiser Hemmung:

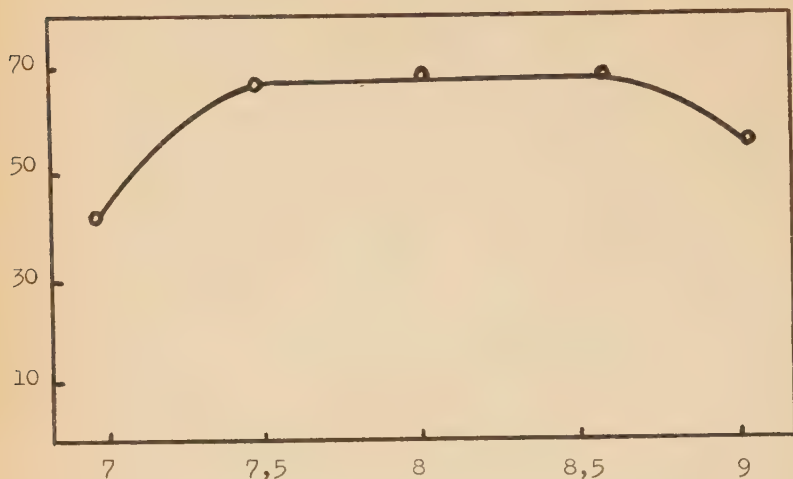
Puffer, Chymotrypsin-Vorgabe und Extrakt werden wiederum auf 2,8 ml Küvettenvolumen verteilt, 2 Min. vorinkubiert und nach Substratzugebe wird die Extinktionsdifferenz wie oben beschrieben bestimmt.

Wird eine Bestimmung bei 35° vorgenommen, so kann auch über entsprechend kürzere Zeitabstände abgelesen werden, da die enzymatische Spaltungsaktivität mit höherer Temperatur ansteigt.

Das Verfahren bei 25° hat den Vorteil, daß nur in den ersten 5 Min. eine sehr geringe Spontanhydrolyse erfolgt. Ferner ist die Gefahr einer Denaturierung oder Aktivierung von Extraktbestandteilen - etwa Enzymvorstufen im wässrigen Pankreashomogenat - geringer.

Bedenken hinsichtlich einer Aktivierung von Pro-Enzymen, die im Extrakt enthalten sind, können dadurch beseitigt werden, daß die Linearität der Extinktionszunahme verfolgt wird. Bei 20° und 25° konnte während der Zeit, über die die Extinktionsdifferenz bestimmt wurde, keine Abweichung von der Linearität beobachtet werden. Auf die gleiche

Abb: 6 Aktivität von 40 μg Chymotrypsin gegenüber SUPHEPA in Abhängigkeit vom pH.



25°. Wellenlänge: 405 $\text{m}\mu$. 0,015 m CaCl_2 . 0,2 m TRIS-Puffer.
Ordinate: $\text{AE} \times 10^3 / 10 \text{ Min}$.

Abszisse: pH

Weise läßt sich ausschließen, daß eine gebildete Chymotrypsin-Inaktivator-Verbindung durch andere Enzyme im Pankreas-homogenat gelöst oder zerstört wird.

Der 2,6 %ige Acetonanteil pro Ansatz beeinträchtigt die Wirkung von Inaktivatoren aus dem Pankreas nicht.

Die Inaktivatormessungen wurden fast immer mit 20 μg Chymotrypsin pro Ansatz durchgeführt. Der CaCl_2 -Gehalt ist in diesem Falle etwa 0,0075 m. Diese Ca^{++} -Konzentration hat sich bei allen Messungen als nicht störend erwiesen. Sollten besondere Bedingungen ein Ca^{++} -freies Milieu erfordern, muß die Chymotrypsinlösung in 0,0025 n HCl bereitet werden. Enzym aus dieser Lösung hat sich nach Zugabe zum Ansatz allerdings als nicht so aktiv und weniger stabil erwiesen.

Eine wichtige Frage betraf die Spezifität des Substrates SUPHEPA. Trypsin⁺⁾ , Kollagenase, Elastase⁺⁺⁾ und Kathepsin spalteten nur in Spuren, sofern sie in vergleichsweise 100-facher Konzentration vorlagen. Papain, Enterokinase, Carboxypeptidase und Pepsin zeigten keine Aktivität gegenüber SUPHEPA bei neutralem pH.

Nagel und Willig ²¹⁾ stellten eine Spaltung von SUPHEPA durch Gewebsproteasen fest: Sie fanden nach Erzeugung einer experimentellen Pankreatitis bei Ratten eine geringe, SUPHEPA-verseifende Aktivität im Pankreas-Homogenat, eine beträchtliche im pankreatitischen Begleitascites, die sich nur zum Teil durch den Kallikrein-Inaktivator "Trasylol" und den Chymotrypsin-Inaktivator Diphenylcarbamyldichlorid (DPC) hemmen ließ. Diese Restaktivität gegenüber SUPHEPA konnten sie nur durch Serum zum Verschwinden bringen. Die Autoren schlossen daraus, daß es sich um eine Pankreas-elastase (Pankreatopeptidase E) handelt. Über ähnliche Beobachtungen im Pankreashomogenat des Rindes wird unten berichtet werden.

SUPHEPA ist nicht nur den Ester- und den natürlichen Proteinsubstraten an Spezifität überlegen, sondern ermöglicht auch eine Umgehung der NH₂-Gruppen-Bestimmung, wie sie bei anderen Amid-Substraten nötig ist. Daß eine solche Gruppenbestimmung in Gegenwart von Begleiteiweißen nicht genau sein kann und keine zuverlässigen Ergebnisse liefert, liegt auf der Hand.

Eine Untersuchung von wässrigen Pankreashomogenaten auf Chymotrypsin-Inaktivatorgehalt ist sowieso nur dann sinnvoll, wenn keine, durch Chymotrypsin verursachte, also durch Kallikrein-Inaktivator ("Trasylol") hemmbare, Spontanaktivität für SUPHEPA besteht.

⁺⁾ Mit Ausnahme der Elastase wurden Präparate der Worthington

⁺⁺⁾ Serva, Heidelberg. Biochemical Corporation benützt.

Tabelle III: Beurteilung der getesteten Methoden im Hinblick auf ihre Brauchbarkeit beim Arbeiten mit Pankreasextrakten.

Substrat	Spezi- fität	Empfind- lichkeit	Repro- duzier- bar	In Gegen- wart von Fremdei- weiß und Enzymvor- stufen	Routine- durch- führbar- keit
SUPHEPA	++	+	++	++	+++
Denaturiertes Haemoglobin	--	++	+	-	+
TEE (Tyrosin- äthylester)	+	++	+	--	+
TEE / ADH	+	++	+	+	(+)
Carbobenzoxy- Tyrosin-p-nitro phenylester	--	(+++)	+	--	+
Benzoylphenyl- alanin-β-naphtyl- ester	+	++	-	-	-

Zusammenfassend soll hier festgehalten werden, daß SUPHEPA sich zur Bestimmung von Chymotrypsin auch in Gegenwart von viel Fremdeiweiß eignet, also Inaktivator in Pankreasextrakten zuverlässig erfaßt werden kann und sich Aktivierungsvorgänge schlüssig verfolgen lassen.

Für die Untersuchungen mit Pankreasextrakten und für die Abgrenzung von Inaktivatoren war es wichtig, zugleich ein handliches Verfahren zur Trypsinbestimmung zur Verfügung zu haben. Analog zu SUPHEPA gibt es, wie erwähnt, eine N-Acyl-aminosäure-p-nitroanilid-Verbindung, die für Trypsin relativ spezifisch ist und auch durch Chymotrypsin

nicht angegriffen wird. Dieses Benzoyl-arginin-p-nitroanilid (BAPA) ermöglicht eine Bestimmung des Trypsins, die einfach und zuverlässig ist. Bezüglich der Einzelheiten des Verfahrens sei auf ⁶⁴⁾ und eine gleichzeitig entstandene Dissertation (Hartwich, München 1965) verwiesen.

Erwähnt sei hier, daß sich 1 mg des Substrates in 1 ml Wasser nach Erhitzen auf 90° vollständig löst und daß seine Spaltung durch Trypsin von Ca^{++} nicht beeinflusst wird, was im Gegensatz zu den bei der Chymotrypsinbestimmung gefundenen Verhältnissen steht. Die Affinität von Trypsin zu BAPA ist wesentlich größer als die des Chymotrypsins zu SUPHEPA.: Bei einer Konzentration von 1 mg BAPA pro Ansatz entwickeln 20 µg Trypsin etwa 2 µg p-Nitroanilin pro Min. Die gleiche Menge Chymotrypsin vermag aus 2 mg SUPHEPA pro Ansatz 0,15 µg p-Nitroanilin pro Min. freizusetzen.

Ebenso wie bei der Chymotrypsinbestimmung mit SUPHEPA, dürfte auch für die Bestimmung des Trypsins im angewandten Meßbereich (10 bzw. 20 µg) auf Grund der linearen Extinktionszunahme gesichert sein, daß die Substratkonzentration genügend hoch ist, d. h. praktisch Substratsättigung vorliegt, um einwandfreie, enzymkinetische Messungen zu gewährleisten.

B. Untersuchungen mit dem Kallikrein-Inaktivator
"Trasylol", bzw. dem Pankreas-Inaktivator von
Kunitz "Iniprol".

Nach Frey, Kraut und Werle ist eine Kallikrein-Inaktivator-Einheit (KIE) die Inaktivatormenge, die bei pH = 8 zwei Kallikrein-Einheiten (KE) zur Hälfte inaktiviert, d. h. ein KE völlig unwirksam macht.

Ahnlich soll hier definiert werden: Eine Trypsin-Inaktivator-Einheit (TIE) ist die Inaktivatormenge, die bei pH 7,8 2 µg Trypsin (Worth. Biochem. Corp.) zu 50 % , also 1 µg Trypsin völlig unwirksam macht.

Entsprechend hemmt eine Chymotrypsin-Inaktivator-Einheit (CIE) 2 µg Chymotrypsin zu 50 % oder ein µg vollständig.

Diese Definition einer 50 %igen Hemmwirkung ist nötig, weil die Hemmung nahe der 100 % - Grenze , wo Inaktivatormenge und Enzymmenge einander äquivalent werden , meist nicht mit der zugegebenen Inhibitormenge linear zunimmt.

Dieser Effekt läßt sich auf eine schwache Dissoziation des Enzyminhibitor-Enzym-Komplexes bei etwa neutralem pH zurückführen.

Nach Kraut et al. 9) hemmt 1 KIE "Trasylol" 1 µg Trypsin und 0,57 µg Chymotrypsin völlig. Die Inaktivierung von Chymotrypsin wurde mit Hilfe der Caseinverdauung nach Anson getestet. Das Verhältnis von Chymotrypsin - zu Trypsin-Inaktivator-Einheiten (CIE : TIE) beläuft sich nach diesen Angaben also auf 1 : 1,75 .

Mit den synthetischen Substraten BAPA bzw. SUPHEPA wurde hier übereinstimmend ermittelt : 1 KIE hemmt 1 μ g Trypsin und 0,53 μ g Chymotrypsin , woraus sich ein Hemmverhältnis von 1 : 1,9 (CIE : TIE) ergibt.

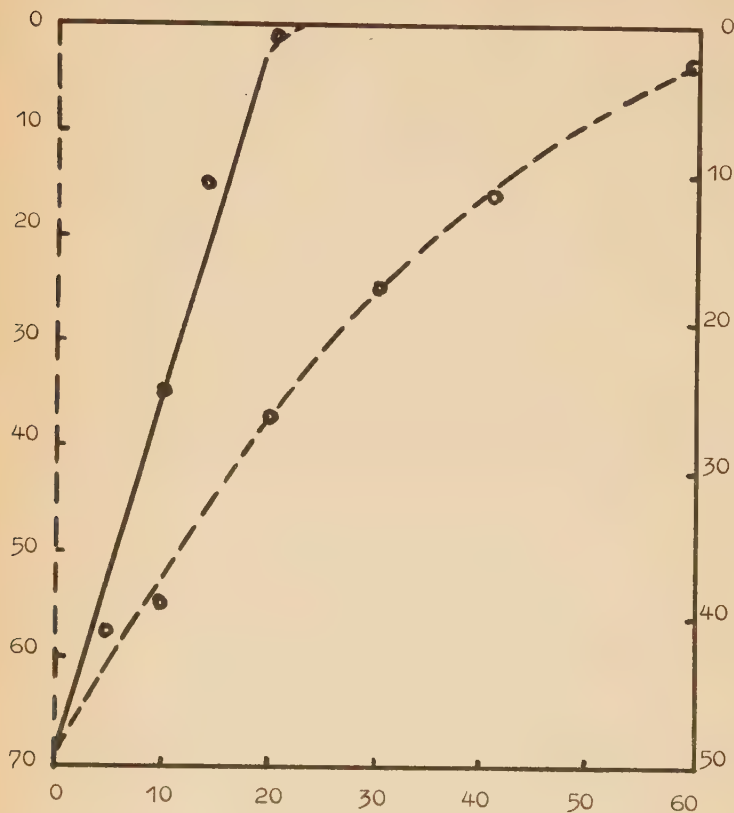
Für den Pankreas-Inhibitor von Kunitz "Iniprol" wurde ein Hemmverhältnis bestimmt (BAPA bzw. SUPHEPA) , das sich ebenfalls auf etwa 1 : 2 (CIE : TIE) beläuft: Ein Festsubstanz-Präparat des Inaktivators (Worth. Biochem. Corp.) hemmt pro μ g 3,7 μ g Trypsin und 2 μ g Chymotrypsin (BAPA bzw. SUPHEPA) ! Daraus errechnet sich das Hemmverhältnis zu 1 : 1,85 (CIE : TIE) .

Der Kunitz'sche Pankreas-Inhibitor zeigte eine Kallikrein-Inaktivierung , die der des Parotis-Inaktivators "Trasylol" entsprach.

Da also der Kallikrein-Inaktivator "Trasylol" und der Kunitz'sche Pankreas-Inaktivator fast sicher identisch sind - Hinweise dafür ergeben sich auch aus dem chemischen und physikalischen Verhalten der beiden Inaktivatoren ⁹⁾ - soll hier in der Folge zusammenfassend von dem Pankreas-Kallikrein-Inaktivator - PKI die Rede sein und das Hemmverhältnis CIE : TIE = 1 : 1,85 als charakteristisch festgehalten werden.

Der PKI wird von Pepsin nur über einen sehr langen Zeitraum etwas ⁴⁴⁾ , von Trypsin gar nicht angegriffen. Auch vom Chymotrypsin wird der PKI , bzw. der Trypsin-PKI-Komplex nicht zerstört.

Abb. 7 : Hemmung der Proteolyse (Substrat: SUPHEPA) von 20 µg Chymotrypsin (unterbrochene Kurve), bzw. Hemmung der Esterolyse (Substrat: TEE) von 40 µg Chymotrypsin bei steigender Kallikrein-Inaktivator-Konzentration.



Inkubationszeit KIE/Chymotrypsin/Puffer: 2 Min. bei 25°.

Unterbrochene Kurve: Substrat = SUPHEPA. 25°. 0,2 m TRAP-Puffer pH 7,8.

Durchgezogene Kurve: Substrat = TEE. 25°. 0,05 m TRIS-Puffer pH 7,0.

Linke Ordinate: $\Delta E / 20 \text{ Min.} \times 10^3$. SUPHEPA: 405 mµ Wellenl.

Rechte " : $\Delta E / 30 \text{ Sek.}$ " . TEE : 236 mµ Wellenlänge.

Abszisse: Kallikrein-Inaktivator-Einheiten = KIE ("Trasylold")

Aus Abb.7 ist ersichtlich , daß der Chymotrypsin-PKI-Komplex bei pH 7,8 etwas dissoziiert (SUPHEPA-Kurve), was sich aus der nicht linear mit der KIE-Konzentration ansteigenden Hemmwirkung ergibt. Dies läßt auf eine kompetitive Hemmung des Chymotrypsins durch den PKI in Gegenwart des Substrates SUPHEPA schließen.

Ferner ist aus Abb. 7 zu entnehmen, daß die Hemmung der Esterolyse von TEE durch Chymotrypsin fast linear erfolgt. Zur Erreichung desselben Hemmgrades benötigt man bei der Hydrolyse von SUPHEPA aber die vier- bis sechsfache Menge an KIE verglichen mit der Hemmung der Esterolyse von TEE durch Chymotrypsin. Seine esterolytische Aktivität wird also wesentlich stärker gehemmt als seine proteolytische.

Um die Affinität des PKI zu Trypsin mit der zu Chymotrypsin vergleichen zu können, wurden folgende Versuche unternommen:

1. Eine Probe wurde mit 20 µg Trypsin und 20 µg Chymotrypsin beschickt, eine zweite, parallel laufende, nur mit 20 µg Trypsin. Beide Proben wurden mit je 10 KIE 2 Min. vorinkubiert: Beim BAPA-Test auf die verbleibende Trypsinaktivität zeigte sich kein Unterschied der beiden Proben bezüglich der Extinktionsdifferenz pro Zeiteinheit.

Daraus ergibt sich, daß der Inaktivator bei den gegebenen Konzentrationsverhältnissen auch in Gegenwart von Chymotrypsin im Überschuß vollständig vom Trypsin besetzt wird. Andererseits vermag das Trypsin das Chymotrypsin aus der einmal eingegangenen Verbindung mit dem Inaktivator auch über einen längeren Zeitraum nicht zu verdrängen:

2. 10 KIE wurden mit 20 µg Chymotrypsin 2 Min. vorinkubiert, dann zusätzlich für weitere 2 Min. bzw. 15 Min. mit 20 µg Trypsin belassen und dessen Hemmung mit BAPA bestimmt. Die beiden Proben ergeben keinen Unterschied: Es besteht eine konstante Trypsinhemmung von nur 15 %.

Dieser Befund spricht ebenfalls dafür, daß der Chymotrypsin-PKI-Komplex bei dem gegebenen pH schwach dissoziiert und sich zwischen allen Reaktionspartnern ein Gleichgewicht einstellen kann, das auch zu der geringen Hemmung des zugegebenen Trypsins führt. Diese Resthemmung wurde mit zunehmendem Chymotrypsinüberschuß im Vorinkubat geringer, da so das Gleichgewicht zugunsten der Bildung des Chymotrypsin-PKI-Komplexes verschoben wird.

Indirekter Nachweis des PKI bzw. der Chymotrypsin-Inaktivierung:

Das Vorhandensein des PKI läßt sich eindeutig qualitativ nachweisen, indem aus dem Hemmverlust für Trypsin zu folgern ist, daß das Chymotrypsin den Inaktivator abgefangen hat, also selbst gehemmt wird. Wie unten zu zeigen sein wird, fehlt dieser Effekt bei Pankreasextrakten, die lediglich einen spezifischen Trypsin-Inaktivator enthalten. Von großer Bedeutung ist ferner, daß man so in Extrakten, die außer dem PKI einen zusätzlichen Trypsin-Inaktivator enthalten, beide nebeneinander nachweisen kann: man fängt den PKI mit Chymotrypsin im Überschuß ab und bestimmt die verbleibende Trypsinhemmung. Da durch vergleichende Untersuchungen mit reinem PKI ausgeschlossen wurde, daß der Chymotrypsin-PKI-Komplex auf das Trypsin eine Hemmwirkung zeigt, läßt sich die verbleibende Trypsinhemmung, sofern sie 10 % übersteigt, nur auf einen zusätzlichen trypsinspezifischen Hemmkörper zurückführen.

Wesentlich ist, daß man in dem oben skizzierten Konzentrationsbereich arbeitet und die Dissoziation des Chymotrypsin-PKI-Komplexes berücksichtigt.

Die hier dargestellten Verhältnisse eröffneten auch Möglichkeiten hinsichtlich der säulenchromatographischen Trennung des PKI von einem spezifischen Trypsin-Inaktivator im Rinderpankreasextrakt. (s. u.).

a) Der Inaktivatorgehalt für Chymotrypsin, Trypsin und Kallikrein im Pankreashomogenat von Mensch, Schwein, Hund und Kaninchen.

Frisches oder eingefrorenes Pankreasgewebe wird eingewogen (Feuchteinwaage). Nach Zerkleinern wird mit der eineinhalbfachen Gewichtsmenge Aqua bidestillata im Eisbad homogenisiert. (Die Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung bringt keine Vorteile). Ein Teil dieses dickflüssigen, konzentrierten Homogenats wird wie unten beschrieben enteiweißt.

Der andere Teil wird nochmals 1 : 1 verdünnt und homogenisiert. Bei 0° und 300.000 g wird 20-30 Min. zentrifugiert. Durch ein Filter wird dekantiert und das wässrige, leicht rötliche Filtrat im Eisbad aufbewahrt. Nach den hier gemachten Erfahrungen zeigt das Homogenat immer dann eine feine Trübung, die nicht durch Zentrifugieren oder Filtrieren zu beseitigen ist, wenn es sich um eingefrorenes Gewebe handelt, das sich nicht von Fettgewebsbestandteilen reinigen ließ. In 15-facher Pufferverdünnung im Ansatz zeigt eine solche Homogenatlösung zunächst keine Trübung mehr. Diese stellt sich aber in feinstster, kolloidaler Form wieder ein, sobald Substrat, (BAPA, SUPHEPA) hinzugegeben wird. In so einem Fall ist dann auf Linearität der Extinktionszunahme zu achten. Ein ähnlicher

Trübungseffekt zeigte sich auch bei gallehaltigen Pankreassekreten (s. u.).

Rinderpankreas eignet sich besonders gut zur Herstellung von wässrigem Nativhomogenat, da es ein gut abgegrenztes Organ darstellt.

Verursacht das Homogenat nach Inkubation im Ansatz eine Trübung, so äußert sich dies in einer sprunghaften Extinktionszunahme in den ersten 10 Min. Danach stellt sich diese meist auf einen annähernd konstanten Wert ein. Beobachtet wurde dies vor allem beim Homogenat aus Menschenpankreas und Schweinepankreas, vorausgesetzt, daß BAPA- oder SUPHEPA-spaltendes Enzym im Ansatz zugegen war. Ist dies nicht der Fall, ergibt die Probe nach etwa 15 Min. keine weitere Extinktionszunahme mehr.

Herstellung eines enteweißten Extraktes:

Konzentriertes Homogenat wird 1:1 mit 6 %iger HClO_4 versetzt und nochmals homogenisiert. Das Zentrifugieren kann anschließend bei 20° und 6 000 U / Min. durchgeführt werden. Um ein späteres Aktivwerden noch im Überstand vorhandener Enzymvorstufen zu vermeiden, muß dieser Extrakt 3 Min. auf 60° erhitzt werden. Danach ist ein rasches Abkühlen im Eisbad erforderlich. Die durch ein Faltenfilter abdekantierte klare Lösung wird mit K_2CO_3 -Lösung auf pH 6 eingestellt. Von im Eisbad vollständig ausfallendem KClO_4 wird nach 10 Min. abdekantiert. Bei 0° hält sich der Extrakt unverändert über einige Wochen.

Soll nur enteweißter Extrakt gewonnen werden, empfiehlt es sich, die Organe direkt in 3 %iger HClO_4 zu homogenisieren.

Pankreas vom Menschen:

Es handelte sich um das Organ einer gesunden Jugend-

lichen, die infolge eines Unglücksfalles verstarb. Das Gewebe wurde wie beschrieben behandelt.

a) Das Nativhomogenat zeigte eine starke, milchige Trübung, die eine Untersuchung mit BAPA, bzw. SUPHEPA unmöglich machte.

b) Der enteweißte Extrakt ergab pro g Feuchtgewebe eine Hemmkapazität von

325 TIE

0 CIE

0 KIE

Zur Ermittlung der Trypsinhemmung (BAPA) wurden 20 µg Trypsin mit 0,1 ml Extrakt inkubiert.

Die Chymotrypsinhemmung wurde ebenfalls mit 20 µg Enzym, jedoch 1,5 ml Extrakt, der 97 TIE enthielt, direkt mit SUPHEPA getestet. Die Extinktionsminderung, die dabei zu beobachten war, entsprach dem Verlust von 2,3 µg Chymotrypsin, also einem zehntel der eingesetzten Enzymmenge. Dies kann nicht als Hemmeffekt angesehen werden, da der Eiweißgehalt und die Konzentrationsverhältnisse einer solchen Probe vom Vergleichswert, der nur Enzym enthält, stark abweichen: Die Pufferkonzentration ist um 65 % niedriger, Salze, Peptide und andere Begleitsubstanzen sind in umso höherem Maße zugegen.

Daß im menschlichen Pankreasextrakt kein dem PKI ähnlicher Inaktivator vorhanden ist, beweist weiterhin die indirekte Messung der Chymotrypsinhemmung und das völlige Fehlen einer Kallikreinhemmung. 10 µg Trypsin ergeben mit 0,1 ml Extrakt eine Extinktionsdifferenz $E = 21 / 2\text{Min.}$ (BAPA). Wird die gleiche Menge Extrakt mit 40 µg Chymotrypsin 2 Min. vorinkubiert, ergibt sich nach Trypsinzugabe nach weiteren 2 Min. Inkubation genau das gleiche E (Extinktionsdifferenz).

Das inkubierte Trypsin ist beide Male gleich stark gehemmt worden, das Chymotrypsin hat also mit dem Inaktivator nicht reagiert. Wäre in dem Extrakt PKI enthalten gewesen, hätte sich für das Trypsin beim zweiten Ansatz ein Hemmverlust ergeben müssen.

Mit dem Estersubstrat Benzoylargininäthylester (BAEE) wurde die Kallikreinhemmung getestet. Extrakt, der 100 mg Pankreas entsprach, vermochte von 5 KE keine zu hemmen.

Schweinepankreas.

a) Das Nativhomogenat konnte nur in bereits gegenüber SUPHEPA aktivem Zustand erhalten werden. 0,5 ml bewirkten bei pH 7,5 eine Extinktionszunahme von $\Delta E = 70 / 20 \text{ Min.}$, bei pH 8,5 dagegen nur ein ΔE von $3 / 20 \text{ Min.}$ Die Spontanaktivität bei pH 7,5 war durch Trasylol nur zum Teil zu hemmen. Die Messungen waren infolge einer kolloidalen Trübung nicht quantitativ durchzuführen. (Hoher Fettgehalt des Schweinepankreas).

b) Im enteiweißten Extrakt fand sich eine Hemmkapazität pro g Feuchtgewebe von

300 TIE und

0 CIE

Die Chymotrypsinhemmung wurde direkt (SUPHEPA) mit einer Extraktmenge getestet, die 30 TIE enthielt.

Hundepankreas.

1. Das Nativhomogenat enthielt 405 TIE / g Feuchtgewebe. Der indirekte Test (s. B. 32 u. 35) ergab ebenso wie die direkte Bestimmung mit SUPHEPA keine Chymotrypsin-Inaktivierung.

2. Enteiweißte Extrakte enthielten

250, 270 und 300 TIE / g Feuchtgewebe.

Berücksichtigt man, daß etwa 25 % des Inaktivators nach einmaliger Extraktion vom ausgefällten Eiweiß adsorbiert werden, so ergibt sich ein maximaler Gehalt von

400 TIE / g Feuchtgewebe. Zugleich wurden für das Chymotrypsin

0 CIE / g Feuchtgewebe bestimmt.

Eine Extraktmenge, die 33 µg Trypsin zu hemmen vermochte, zeigte weder bei direkter Messung (SUPHEPA, 20 µg Chymotrypsin), noch auf indirektem Wege über eine mögliche Inaktivator-Chymotrypsin-Komplexbildung einen Gehalt an PKI (s. S. 32 u. 35).

Mit der Bestimmungsmethode nach Green und Work mit Harnstoff-denaturiertem Haemoglobin konnte ebenfalls keine Inaktivierung des Chymotrypsins festgestellt werden.

Andere Resultate brachte jedoch die Bestimmung der Esterolysehemmung eines verdünnten Extraktes mit TEE:

3 g Gewebe wurden in 26 ml 3 %iger HClO_4 homogenisiert. Es wurde eine Hemmung der Chymotrypsinesterolyse ermittelt, die 19 CIE / ml entsprach. Die gleiche Menge Extrakt enthielt 35 TIE. (BAPA). (Über methodische Bedenken s. S. 18, und Diskussion S. 63).

Kaninchenpankreas.

2,75 g Gewebe wurden mit 5,5 ml 3 %iger HClO_4 homogenisiert und wie oben beschrieben weiter behandelt. Der Inaktivatorgehalt betrug

72 (105) TIE / g Feuchtgewebe (BAPA)

23 (30) CIE / " " (SUPHEPA). Das Hemmverhältnis CIE : TIE betrug demnach

1 : 3,2

b) Rinderpankreas

Wie bereits dargestellt wurde, ist das Pankreas vom Rind für die Untersuchung des wässrigen Nativhomogenats besonders gut geeignet, und zwar vor allem im Hinblick auf die Verwendung von SUPHEPA, bzw. BAPA. Da es sich um verschiedene Versuche handelt, wurden diese übersichtlich in Tabelle IV und V zusammengestellt. Daß nicht immer vergleichbare Werte gefunden wurden, soll an anderer Stelle (Diskussion) zu erklären versucht werden. Hier sollen Gemeinsamkeiten und Zusammenhänge, die sich durch die Versuche in Tabelle IV und V ziehen, aufgezeigt werden.

1. Wiederholt, jedoch nicht immer reproduzierbar, wurde im frisch homogenisierten, wässrigen Pankreasextrakt eine Spontanaktivität gegenüber BAPA festgestellt. Sie war, wie aus den Versuchen 4 und 6 zu ersehen ist, mit "Trasylol" nicht zu hemmen. (Eine Ausnahme macht Versuch 8, bei dem jedoch nicht eingefrorenes oder frisches Pankreas

Tabelle IV: Versuche mit wässrigen Rinderpankreas-homogenaten.

	BAPA-Spon- tanaktivität: µg p-Nitro- anilin / Min. / g Feuchtgew.	Trypsin- hemmung: TIE / g F.gew.	SUPHEPA-Spon- tanaktivität: µg p-Nitro- anilin / Min. / g F.gew.	Chymotryp- sinhemmung: CIE / g F.gew.	Hemmver- hältnis CIE:TIE; PKI-An- teil
1)	keine	280	keine	32 (dir./ind.)	1 : 9 22%
nach 3 ^h)	16,3 (15 x TIE ⁺) nicht hemmb.)	104 (64% TIE Verlust)	7,4 (5 x CIE ⁺) hemmt 100 %)	keine (dir./ind.)	- - -
2)	keine	290	0,8 (5 x CIE nicht hemmb.)	43 (direkt)	1 : 3,5 57%
nach 3 ^h)	keine	geringer	8 (2 x CIE nicht hemmb.)	keine (direkt)	- - -
3)	keine	300	0,4	90 (dir./ind.)	1 : 3,3 61%
nach 6 ^h)	keine	175 (42 % Verlust)	0,4	50 (dir./ind.) 40 % Verl.	1 : 3,5 57%
4)	18,2 (12 x TIE nicht hemmb.)	270	1,63 (3 x CIE 33 % hemmbar)	keine (direkt)	- - -
nach 3 ^h)	25 (10 x TIE nicht hemmb.)	keine	21 (11 x CIE, 2 x CIE: 50 % gehemmt)	keine (direkt)	- - -
5)	3,3	120	0,6	keine (indirekt)	- - - s. dag. Vers. 3)
6)	57 (20 x TIE nicht hemmb.)	410	keine	keine (direkt)	- - -
7)	15,5	380	keine	keine (dir./ind.)	- - -
8)	9,8 (40 x TIE ⁺) 60% gehemmt)	keine	4,9 (2,5 x CIE 55 % gehemmt).	keine (indirekt)	- - -

*) : verwandt wurde statt "Trasylol" "Iniprol".

Tabelle V: Versuche mit enteiweißten Rinderpankreas-extrakten.

	Trypsin- TIE / g F.gew.	Chymotryp- sinhemmung: CIE / g F.gew.	SUPHEPA- Spontanak- tivität: µg p-Nitro- anilin /Min./g	Hemmver- hältnis: CIE:TIE PKI-An- teil	Zunahme: % TIE
Zu 1)	442	87	- - -	1 : 5 40%	32%
Zu 2)	492	123	- - -	1 : 4 50%	41%
Zu 4)	410	82	- - -	1 : 5 40%	30%
nach 3 ^h entei- weißt	unver- ändert	unver- ändert	11,2!		
9)	530	160	1,6 (10 x CIE 55 % ge- hemmt) Durch Er- hitzen be- seitigt.	1 : 3,3 61%	

Erläuterungen zu Tabelle IV und V:

Die Spalte 5 senkrecht in Tabelle V betrifft die Zunahme an Trypsin-Inaktivator gegenüber dem entsprechenden wässrigen Homogenat.

x TIE = Überschuß an Trypsin-Inaktivator-Einheiten pro Ansatz

x CIE = " " Chymotrypsin-Inaktivator- " " "

Die spontanenzymatisch aus BAPA und SUPHEPA freigelegten Mengen p-Nitroanilin sind nicht vergleichbar: Eine Chymotrypsin-Enzym-Einheit vermag z.B. weniger als 1/10 p-Nitroanilin pro Zeiteinheit aus SUPHEPA zu entwickeln, verglichen mit der BAPA-Spaltungsrate einer Enzym-Einheit Trypsin.

verwandt wurde, sondern ein 24 Stunden bei 4° gelagertes!) Aus diesem Verhalten ist zu entnehmen, daß die im Homogenat vorhandene Enzymaktivität nicht von Trypsin verursacht sein kann. Dem entspricht die Tatsache, daß in demselben Homogenat zugleich auch freier Trypsin-Inaktivator gefunden wurde. (Vers. 4, 6 u. 7)).

In keinem der drei Versuche konnte eine Chymotrypsinhemmung ermittelt werden, obwohl der Trypsin-Inaktivatorgehalt nicht gering, in den Versuchen 6) u. 7) sogar beträchtlich war. Unabhängig und nicht parallel mit der Spontanaktivität gegenüber BAPA zeigten Homogenate auch Aktivität gegenüber SUPHEPA (Vers. 2, 3, 4 u. 5). Diese "SUPHEPA-Aktivität" des frischbereiteten Extraktes konnte nur in Versuch 4, und dort nur zum kleineren Teil mit "Trasylol" gehemmt werden. Aus Versuch 2) u. 3) geht hervor, daß sich neben der bestehenden Spontanaktivität gegenüber SUPHEPA auch Chymotrypsin-Inaktivator findet. Er ist in Versuch 3) offenbar in maximaler Konzentration vorhanden. Bemerkenswert an Versuch 1, 2) u. 3) ist, daß die Homogenate keine Spontanaktivität gegenüber BAPA einerseits, aber Chymotrypsin-Inaktivatorgehalt andererseits zeigten. Daß bei BAPA aktiven Homogenaten, (Vers. 4, 5, 6 u. 7) dagegen keine Chymotrypsinhemmung festzustellen war, muß auf das Fehlen des freien PKIs, auf den die Chymotrypsinhemmung zurückgeht, bezogen werden. In diesen Fällen wurde nur eine Trypsinhemmung festgestellt, die offenbar an die Gegenwart eines zweiten, nur das Trypsin hemmenden Inakti-

vators gebunden ist. Daß zwei verschiedene Inaktivatoren im wässrigen Homogenat vorliegen können, wurde in Versuch 1) u. 3) dadurch indirekt nachgewiesen, daß der enthaltene PKI über die Chymotrypsin-PKI-Komplexbildung abgefangen und die verbleibende Trypsinhemmung bestimmt wurde. In Versuch 5) u. 7) konnte so keine Minderung der Trypsinhemmung erhalten werden, da kein PKI vorlag. (Über angewandte Versuchsbedingungen und Konzentrationsverhältnisse siehe unten).

2. In den Versuchen 1), 2), 3) u. 4) wurden die Homogenate 3 bis 6 Stunden bei 25° bis 35° inkubiert. In Versuch 2) u. 3) war auch nach 3, bzw. 6 Stunden keine "BAPA-Spontanaktivität" festzustellen, der Gesamttrypsin-Inaktivatorgehalt hatte abgenommen, bei Versuch 3) in gleichem Maße auch die Chymotrypsinhemmfähigkeit. Die "SUPHEPA-Spontanaktivität" hat in 3) gar nicht, in 2) auf das 10-fache zugenommen. Sie konnte durch "Trasylol" nicht beeinflusst werden.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen von 1) und 4), wo sich die "BAPA-Spontanaktivität" in beträchtlichem Maße einstellte, bzw. vergrößerte und mit ihr eine starke SUPHEPA-Aktivität in Erscheinung trat. Letztere muß in Versuch 1) ganz, in Versuch 4) zu 50 %, auf freies Chymotrypsin zurückgeführt werden, da sie mit "Iniprol" ganz, bzw. zu 50 % hemmbar war. In diesen beiden Versuchen war ebenso wie in Versuch 2) keine Chymotrypsinhemmung mehr nachzuweisen. Der PKI ist dagegen in Versuch 3) nach 6 Stunden noch vorhanden, hat jedoch beträchtlich abgenommen, was an

der geringeren Chymotrypsinhemmung abzulesen ist. In keinem Fall konnte eine mit "Iniprol" oder "Trasylol" hemmbare, also auf freies Trypsin zurückzuführende Spontanaktivität gegenüber BAPA gefunden werden. (Nicht vergleichbare Voraussetzungen in Versuch 8)).

5. Aus Tabelle V gehen die Verhältnisse hervor, die im enteiweißten Extrakt bei den verschiedenen Versuchen gefunden wurden. Die Versuche 1), 2), u. 4), in denen Extrakte sofort nach dem Homogenisieren enteiweiß wurden, zeigen, daß Trypsin-Inaktivator jeweils in reproduzierbaren und vergleichbaren Mengen vorliegt. Gegenüber dem entsprechenden wässrigen Nativhomogenat liegt die Inaktivator-Konzentration im enteiweißten Extrakt um durchschnittlich 50 % höher; wenn man den beim Ausfällen des Eiweißes adsorbierten Inaktivatoranteil berücksichtigt, ergibt sich sogar eine bis zu 100 % höhere, also die doppelte Konzentration, verglichen mit der niedrigsten effektiven Ausbeute (Versuch 2)).

Das in Versuch 4) nach 3 Stunden Autolyse enteiweißte Homogenat zeigt unveränderte Verhältnisse, was den Inaktivatorgehalt betrifft, jedoch eine beträchtliche Spontanaktivität gegenüber SUPHEPA. Diese ist allerdings um 45 % geringer, als bei dem entsprechenden, gleichzeitig getesteten Nativhomogenat. Aus Versuch 9), bei dem ebenfalls nach 3 Stunden enteiweiß wurde, geht hervor, daß eine solche Aktivität auch durch Freies nicht denaturiertes Chymotrypsin verursacht sein kann.

Aus den Versuchen 1), 4) u. 9) ist zu entnehmen, daß sich durch Enteiweißen der chymotrypsinhemmende Inaktivator immer und ganz unabhängig von den im Homogenat bestehenden Verhältnis-

sen darstellen läßt. Der PKI liegt auch dann nach dem Anteiweißen in vergleichbaren Mengen vor, wenn er im Nativhomogenat nicht nachgewiesen werden konnte. Er macht offenbar im Wesentlichen den Inaktivatorzuwachs aus.

Versuchsbedingungen:

Die Homogenate wurden meist so bereitet, wie es am Anfang dieses Kapitels beschrieben ist. Zur Bestimmung der Trypsin-Inaktivierung wurden pro Ansatz 10 oder 20 μg Enzym und 0,1 - 0,3 ml inaktivatorhaltige Lösung verwendet. Chymotrypsin wurde in gleichen Mengen eingesetzt, jedoch mit 0,3 - 1 ml Inaktivatorlösung inkubiert. Das Endvolumen der Ansätze betrug 3 ml. Wie in Kapitel A d dargestellt, wurde mit 0,2 M TRAP-Puffer und einer Konzentration von 2 mg SPHEPA-bzw. 1 mg BAPA-Substrat pro 3 ml Ansatzvolumen gearbeitet. Die Versuche auf "Trasylol"-bzw. "Iniprol"-Hemmbarkeit wurden mit den aus der Tabelle zu ersiehenden überschüssen an Inaktivator-Einheiten durchgeführt.

Der indirekte Nachweis des rKI soll anhand von Versuch 1) hier nochmals beschrieben werden: 0,2 ml Nativhomogenat, das keine Spontanaktivität zeigt, ergibt mit 20 μg Trypsin ein ΔE von 23/Min. wird die gleiche Menge Homogenat 2 min. mit 40 μg Chymotrypsin vorinkubiert und dann erst mit Trypsin versetzt, beträgt das ΔE 32/Min. (BAPA). Da 20 μg Trypsin ein ΔE von 54/Min. bewirken, errechnet sich, daß jetzt rund 3 μg Trypsin weniger gehemmt wurden: Das Chymotrypsin hat mit dem vorhandenen rKI einen Komplex gebildet. Da das Hemmverhältnis CIE : TIE für den rKI fast 1 : 2 beträgt, ergibt sich, daß 0,2 ml Homogenat 1,5 μg , 1 ml also 7,5 μg Chymotrypsin hemmen, was sich auch in etwa durch die direkte Bestimmung der Chymotrypsin-Inaktivierung mit SUMHEPA bestätigen läßt.

Das gleiche Homogenat (Versuch 1)) zeigte nach 3 Stunden eine Spontanaktivität gegenüber BAPA, sodaß 0,4 ml ein ΔE von 40/Min. bewirkten. Die gleiche Menge Homogenat mit 20 μg Trypsin inkubiert ergab ein ΔE von 73/Min. Die Summe der vom Homogenat verursachten und der von den 20 μg Trypsin bewirkten Hydrolyse hätte eine Extinktionsdifferenz von 94/Min. ausgemacht,

wären nicht 8 µg Trypsin inaktiviert worden. Das gleiche ΔE ergab sich auch nach Vorinkubieren mit 40 µg Chymotrypsin (73/Min.), woraus zu entnehmen ist, daß nun kein PKI mehr, jedoch noch Trypsin-Inaktivator vorhanden ist.

Zu Versuch 2): Nach Enteiweißen ergibt sich gegenüber dem Nativhomogenat ein Zuwachs an Inaktivator für Chymotrypsin und Trypsin im Verhältnis von 1 : 2,1, woraus zu schließen ist, daß vor allem PKI hinzugekommen ist.

Zu Versuch 3): Das Homogenat zeigt keine Spontanaktivität gegenüber BAPA und nur eine sehr geringe gegenüber SUPHEPA. Das homogenat wurde bei 27° über vier Stunden inkubiert. Dabei nahm die Trypsin-Gesamthemmung um 20 % ab. Nach einer weiteren Stunde bei 35° hatte sie um insgesamt 40 % abgenommen. Zugleich hatte sich auch der Chymotrypsin-Inaktivatorgehalt um 45 % verringert, d.h. die Inaktivatorabnahme betraf ausschließlich den PKI. Während einer weiteren Stunde bei 35° änderte sich an diesen Verhältnissen nichts mehr.

Zu Versuch 5): Das Homogenat ist das Gleiche wie in Versuch 3), wurde jedoch aus einer bodennahen Fraktion der Zentrifugenröhrchen gewonnen und zeigte eine ganz geringe Trübung. Es bewirkte eine geringe Spontanhydrolyse von BAPA und enthielt keinen Chymotrypsin-Inaktivator, also keinen PKI. Der Trypsin-Inaktivatorgehalt war um 50 % niedriger.

Zu Versuch 8): Die hier erhaltenen Ergebnisse können zu den anderen Versuchen nicht in Beziehung gesetzt werden, da es sich um Pankreas handelte, das bei 4° 24 Stunden aufbewahrt worden war, also weder frisch noch eingefroren war. Bemerkenswert ist aber trotzdem, daß aktives Trypsin und das Fehlen jeglichen Inaktivators festgestellt werden konnte.

Zu Versuch 9): Das Homogenat wurde sofort, nach 1,5 und nach 3 Stunden enteiiweißt; der nach 3 Stunden gewonnene Extrakt zeigte eine Spontanhydrolyse von SUPHEPA, die durch Erhitzen bei pH 1,5 jedoch beseitigt werden konnte. Die Hemmverhältnisse waren dann wie nach 0 und 1,5 Stunden.

Die folgenden Versuche sollten dazu beitragen, die im Rinderpankreas gefundenen Verhältnisse weiter zu klären.

I. Der Trypsinogen-Gehalt des Rinderpankreas betrug etwa 5 mg / g Feuchtgewebe, der Chymotrypsinogen-Gehalt etwa 7 mg / g Feuchtgewebe."

II. Zur Aktivierung von Chymotrypsinogen:

1. Trypsinogen wurde mit Enterokinase im Überschuß in Ca^{++} -haltigem Milieu 15 Min. bei 35° inkubiert. Der Test mit BAPA ergab eine vollständige Aktivierung des Trypsinogens.

2. Der gleiche Ansatz wurde mit Chymotrypsinogen versehen: Nach 15 Min. sind beträchtliche Mengen Chymotrypsin aktiv.

3. Der gleiche Ansatz wie in Nr. 2. wurde vor der Chymotrypsinogenzugabe mit soviel spezifischem, aus Schweinepankreas angereichertem Trypsininaktivator versetzt, daß alles aktiv werdende Trypsin abgefangen werden kann: Weder nach 15 noch nach 30 Min. bei 35° ist Aktives Chymotrypsin nachzuweisen.

III. Pankreaseselastase:

0,01 ml Pankreaseselastasesuspension bewirkt in Gegenwart von Chymotrypsinogen keine Hydrolyse von SUPHEPA.

IV. Affinität des Trypsins zum PKI bzw. zum Trypsininaktivator aus Schweinepankreas (SPI):

1. 40 TIE "Iniprol" und 40 TIE SPI wurden mit 10 µg Trypsin 2 Min. vorinkubiert und dann mit 20 µg Chymotrypsin versetzt; nach abermals 2 Min. wurde die Chymotrypsinhemmung bestimmt (SUPHEPA). Diese war nur gering. 80 % des PKI waren vom Trypsin besetzt worden, obwohl zugleich eine äquivalente Menge SPI vorlag.

2. Nach Inkubation der doppelten Menge an SPI, wurden nur noch 30 % des PKI vom Trypsin besetzt.

C. Säulenchromatographische Trennung des Pankreas-
kallikrein -Inaktivators von einem spezifischen
Trypsin-Inaktivator im Rinderpankreasextrakt.

Zur Methodik:

Die Anreicherung und weitgehende Isolierung von peptid-
artigen Inaktivatoren ist in den letzten Jahren wiederholt
beschrieben worden. ⁶⁵⁾ Auch zur Darstellung des PKI wurde
die Säulenchromatographie bereits angewandt. ^{65, 66)}

Die hier verwendeten Sephadex-Stärkesäulen bestehen aus
feinen, unlöslichen, aber hydrophilen Mikrokörnchen, die
sich ihrerseits aus einem dreidimensionalen Netzwerk von
Polysaccharidketten zusammensetzen. Die so gebildeten "Ma-
schen" dieser quervernetzten Dextrane verhalten sich la-
dungsneutral. Das Netzwerk der Mikromaschen ist um so po-
röser, je geringer die Quervernetzung ist. In Wasser kommt
es zu einer Quellung, deren Umfang von der Porosität, also
dem Grad der Vernetzung abhängt. Dadurch können sich die
Gelkäfige entfalten, womit eine wichtige Voraussetzung
für die Trennung von Substanzen verschiedener Molekül-
größen gegeben ist: Moleküle, die in den Gelkäfigen Platz
finden, werden gegenüber den ausgeschlossenen, größeren
verzögert eluiert.

Sephadex G 25 besitzt für Polysaccharide eine Ausschluß-
grenze von MG ca. 3 000, Sephadex G 50 eine von MG ca.
10 000. Für Proteine beträgt die Ausschlußgrenze aber je-
weils das 4-fache.

Die Mikrostruktur der Sephadexdextrane ist auch in Salz-
lösungen und in mäßig saurem und mäßig alkalischem Be-
reich stabil. Sephadex G 25 eignet sich vor allem auch
zur Entsalzung. Eine Trennung von Peptiden und Proteinen
wird maßgeblich beeinflusst durch die Säulenhöhe, die Durch-
flußrate und die Größe der Molekularsiebe (Gelkäfige). Die
jeweils optimalen Bedingungen werden vom Trennungsproblem
bestimmt.

Während sich Moleküle mit quervernetzten Dextranen nach ihrer Größe trennen lassen, werden sie durch Ionenaustauscher nach ihrer effektiven Ladung, die von der Aminosäurezusammensetzung bestimmt wird, getrennt.

Die hier benützten Ionenaustauscher sind Cellulosen, die negative oder positive prosthetische Gruppen tragen und sich infolge ihres hydrophilen Charakters gerade zur Trennung von Proteinen als geeignet erwiesen haben.

An der dichtmaschigen Matrix sitzen die Ankergruppen mit dem Festion ($\text{CM-Cellulose} = -\text{OCH}_2\text{COO}^-\text{H}^+ = \text{Kationenaustauscher}$. $\text{DEAE-Cellulose} = -\text{OC}_2\text{H}_4\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)^+\text{Br}^- = \text{Anionenaustauscher}$). Das austauschbare ist das sog. Gegenion (H^+ , bzw. Br^-). Es wird so lange ausgetauscht, bis alle "Ankerplätze" besetzt sind. Das Arbeiten mit den Austauschersäulen gliedert sich in drei Abschnitte:

1. Der eigentliche Ionenaustausch, während dem eine Lösung aufgefangen wird, die das Gegenion und solche Ionen enthält, die eine gleiche Ladung wie das Festion besitzen.
2. Das Waschen, durch das übriges Lösungsmittel entfernt wird,
3. Das Eluieren des eingetauschten Gegenions mit einem entsprechenden Salz.

So können Moleküle gleicher Größe auf Grund ihrer verschiedenen Ladungen getrennt werden.

Wie bei den Sephadexdextranen sind auch hier die Bedingungen durch Säulenhöhe, Durchflußgeschwindigkeit und - weniger - die Porosität gegeben.

Aufarbeitung von Rinderpankreas

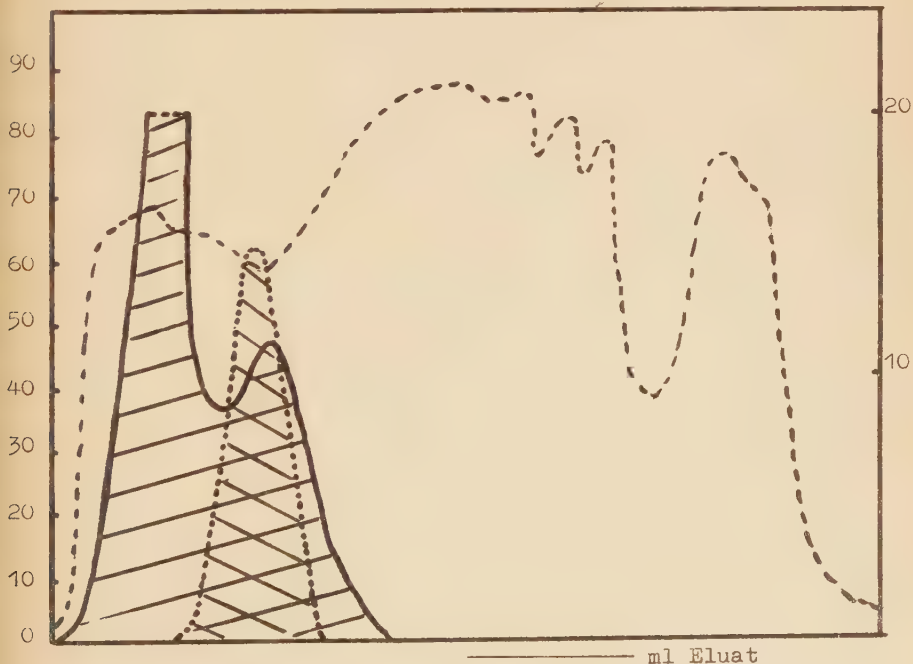
1 kg Pankreas wurde sorgfältig von Fett- und Bindegewebe freipräpariert und mit wenig Wasser (aqua bidest.) im Fleischwolf zerkleinert. Anschließend wurden davon je 100 g in 600 ml 3 %iger HClO_4 homogenisiert. Nach Zentrifugieren bei 6 000 U pro Min. wurde der Überstand 3 Min. auf 60° erhitzt, um die inaktiven Proenzyme zu zerstören. Nach raschem Abkühlen in einem Eisbad wurde mit K_2CO_3 -Lösung auf neutrales pH zurückgestellt und vom ausgefallenen KClO_4 abdekantiert.

Durch Enterokinase konnte danach kein Trypsinogen mehr aktiviert werden. Der so erhaltene Extrakt wurde eingefroren und portionsweise lyophilisiert. (1. Lyophilisat).

1. Reinigungsschritt: Sephadex-Gelfiltration.

Sephadex G 25 wurde in aqua bidest. öfters aufgeschwemmt und nach jeweiligem Sedimentieren und Dekantieren in eine Säule von 80 cm Höhe und 4 cm Durchmesser eingeschlemmt. Nach der Aufgabe von 20 mg des 1. Lyophilisates wurde das Eluat in Fraktionen von ca. 8 ml aufgefangen und 0,1 ml jeder Fraktion auf Trypsin- bzw. Chymotrypsin-Inaktivator getestet. Die Absorptionsmessung erfolgte gleichzeitig im Uvicord, die Fraktionierung durch einen Trommelrefraktomat.

Abb. 8 : Entsalzung an Sephadex G 25 .

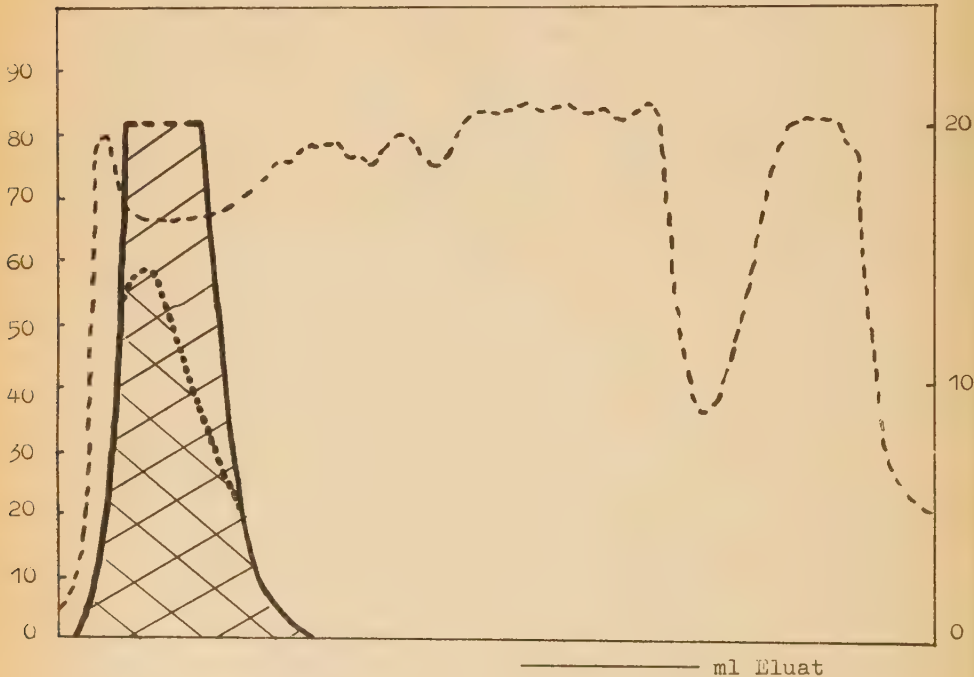


Lösungsmittel = Aqua bidest. Aufgabe = 20 mg Lyophilisat 1.
Rechte Ordinate: Trypsin-Inaktivierung (—), Chymotrypsin-Inaktivierung (···) in μg gehemmtes Enzym / 0,1 ml Eluat.
Linke Ordinate: Absorption bei 280 m μ in %.

Abb. 8 zeigt, daß der Trypsin-Inaktivator in zwei Phasen erscheint und nur der zweite Anteil auch Chymotrypsin hemmt. Aus Abb. 9 läßt sich dies nicht entnehmen: Nach Aufgabe der 10-fachen Menge von Lyophilisat 1 wird im Eluat die Trypsin- und die Chymotrypsinhemmende Aktivität gleichzeitig aufgefangen, ein Hinweis darauf, daß die zwei vorhandenen Inaktivatoren ein ähnliches Molekulargewicht besitzen.

Die erhaltene salzfreie Inaktivatorlösung wurde wieder Lyophi-

Abb. 9 :Entsalzung von 200 mg Lyophilisat 1.



Bedingungen wie in Abb. 8 .
Ordinaten " " " " .

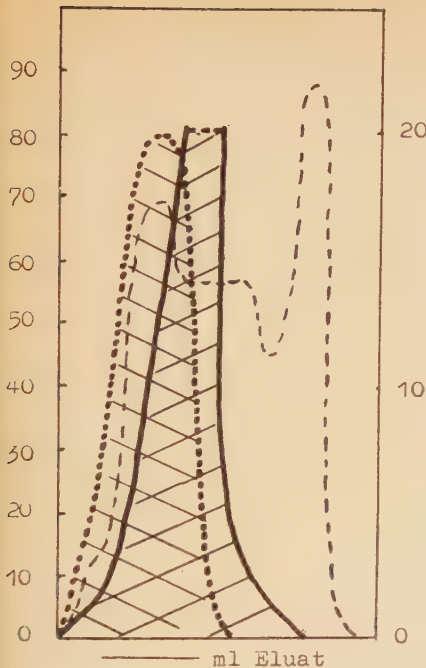


Abb. 10 : Fraktionierung an Sephadex G 50.

Aufgabe = 250 mg Lyophilisat 2 (nach Entsalzen über Seph. G 25) Bedingungen wie Abb. 8 u. 9.

lisiert (Lyophilisat 2).

Abb. 10 zeigt, daß nach Aufgabe von 250 mg Lyophilisat 2 auf

Sephadex G 50 der Chymotrypsin-Trypsin-Inaktivator im Eluat bereits abnimmt, wenn die Trypsin-Inaktivator-Konzentration ihr Maximum erreicht.

Eine eigentliche Trennung ist jedoch auch hier nicht erfolgt.

Die Anwendung von Ionenaustauschern

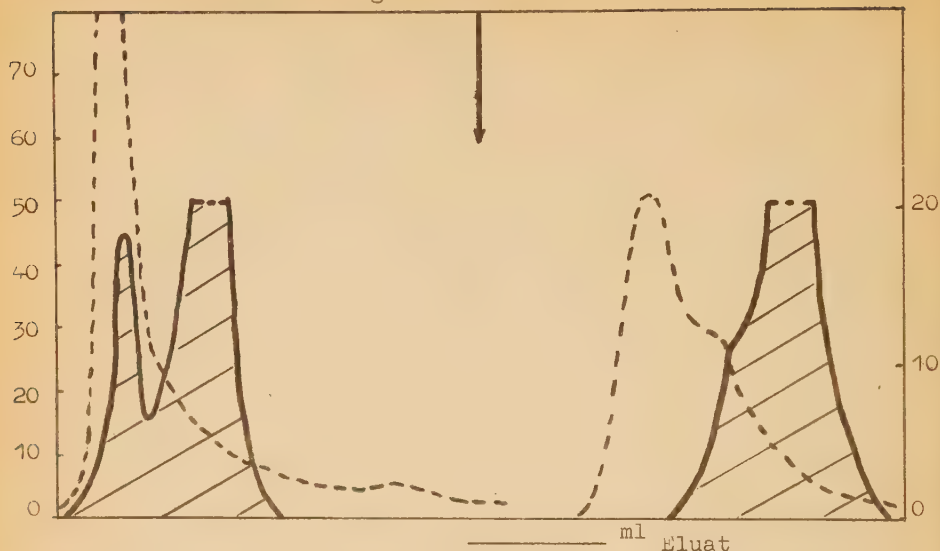
lag nun nahe.

Fraktionierung an Cellulose - Ionenaustauschern:

Wie Abb. 11 zeigt, fand mit CM-Cellulose eine Trennung in eine saure und eine basische trypsinhemmende Proteinfraction statt, wobei erstere in zwei Phasen erschien. Da sich die beiden gesuchten Inaktivatoren, der PKI und ein weiterer Trypsin-Inaktivator, bei dem gegebenen pH 6 als basische, d.h. positiv geladene Polypeptide hätten verhalten sollen, wurde die unerwartet erhaltene Auftrennung in einen "kationischen" und einen "anionischen", trypsinhemmenden Anteil auch an DEAE-Cellulose zu reproduzieren versucht. (Isoelektrischer Punkt des PKI bei pH 10, des TI = Trypsin-Inaktivator bei pH größer 10^+).

⁺) Der IEP des aus Hundepankreas dargestellten TI liegt ebenfalls über pH 10. Private Mitteilung von H. Hartwich.

Abb. 11 : Fraktionierung an CM-Cellulose.

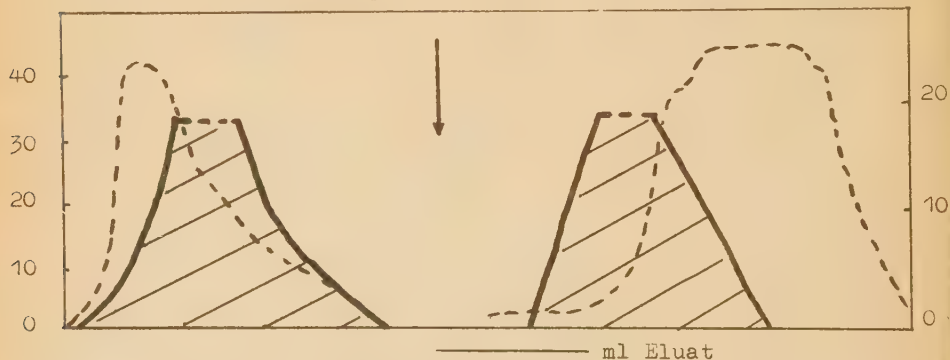


Aufgabe: 100 mg Lyophilisat 2. Lösungsmittel: 0,01 m K-Phosphat-Puffer vom pH 6. Pfeil: Beginn der Elution mit 5 %iger NaCl-Pufferlösung.

Rechte Ordinate: μg Trypsin gehemmt / 0,01 ml saure (links) bzw. basische (rechts) Proteinelösung.

Linke Ordinate: Absorption bei 280 mμ in %.

Abb. 12 : Fraktionierung an DEAE-Cellulose.



Aufgabe: 3,3 g Lyophilisat 2. Säule: 30 x 3,5 cm. Lösungsmittel: 0,01 m K-Phosphat-Puffer vom pH 7. Pfeil: Beginn der Elution mit 10 %iger NaCl-Puffer-Lösung.

Rechte Ordinate: μg Trypsin gehemmt / 0,1 ml basischer, nicht zurückgenaltener Proteine (links), bzw. saure, mit NaCl eluierte, Proteine (rechts).

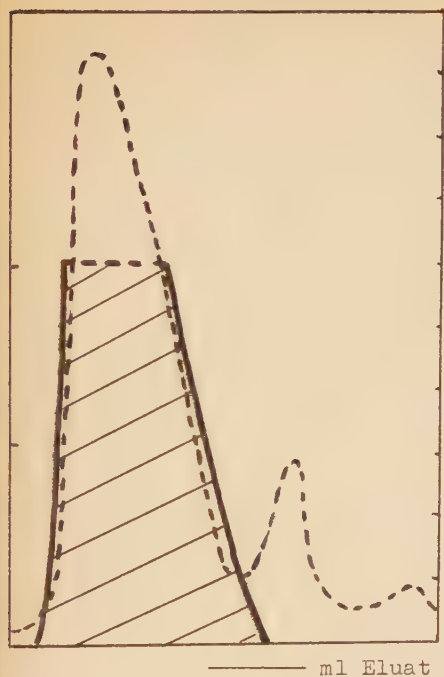


Abb. 13 : Entsalzen
von Lyophilisat 3.

Oben: Sephadex G 25,
Aqua bidest.
Bas. r Proteinanteil

Unten: Sephadex G 25
Aqua bidest.
Saurer Proteinanteil.

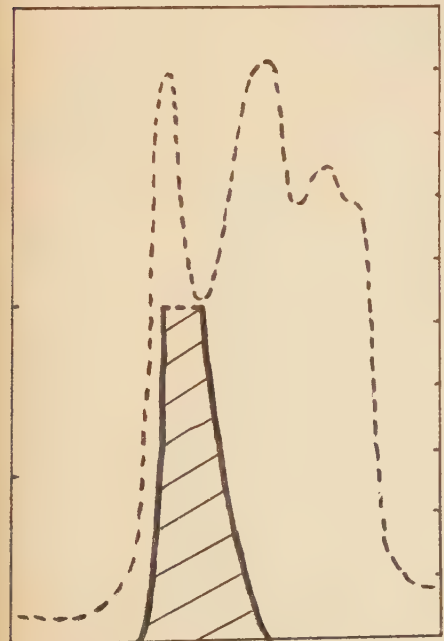
Linke Ordinate: μg Trypsin
gehemmt / 0,1 ml Eluat
Rechte Ordinate: gemessene
Absorption bei 280 m μ in %

Dem, während CM-Cellulose
ein schwach saurer Kat-
ionenaustauscher ist,
wirkt DEAE-Cellulose als
Anionenaustauscher im
mittelbasischen Bereich.

2. Reinigungs- = 1. Tren-
nungsschritt:

Eine Säule (3,5 x 30 cm)
wurde, wie oben beschrie-
ben mit DEAE-Cellulose vor-
bereitet.

Wie Abb. 12 zeigt, befand
sich im zuerst eluierten
"Kationenanteil" wieder-
um Trypsin-Inaktivator.
Nach Waschen der Säule
mit Puffer wurde mit



10 %iger NaCl-Puffer-Lösung der "anionische" Anteil eluiert und auch dort Trypsin-Inaktivator gefunden.

Es wurden 3,3 g Lyophilisat 2 aufgegeben. Diese enthielten 72 000 TIE. In den 335 ml des Kationenanteils, die Trypsin-Inaktivator enthielten, fanden sich 52 000 TIE, in den 135 ml des Anionenanteils 20 000 TIE.

Die schon an CM-Cellulose gefundene Auftrennung in eine Basische (kationische) und eine saure (anionische), trypsin-hemmende Proteinfraktion hat sich also auch an DEAE-Cellulose eingestellt. (Abb. 12).

Gleichzeitig wurde als wesentliches Ergebnis gefunden, daß der Inaktivator im Kationenanteil überwiegend nur Trypsin hemmte, der Anionenanteil dagegen ein Verhältnis von CIE:TIE aufwies, das fast dem PKI entsprach.

Die beiden Proteinfraktionen wurden, wie Abb. 13 zeigt, mittels einer Sephadex G 25 - Säule entsalzt und anschließend wieder lyophilisiert (Lyophilisat 3).

Untersuchung der sauren Proteinfraktion (Lyophilisat 3):

Gewonnen wurden 0,22 g Festsubstanz aus einem kg Pankreas. 5 mg davon wurden in 2 ml Aqua bidest. gelöst. Von dieser Lösung hemmten 0,2 ml 38 µg Trypsin und 16 µg Chymotrypsin = 76 TIE und 32 CIE / mg.

Etwa 14 TIE / mg sind mehr enthalten, als dem lKI entspräche. Das Verhältnis von TIE:CIE beträgt 2,4:1, statt 1,9:1. Es errechnet sich für das Trypsin eine nicht auf PKI zurückzuführende Mehrhemmung von 23 %.

Aus dem Gehalt von 52 KIE / mg ergibt sich das Verhältnis von CIE:KIE zu 1:1,63, also so, wie es für den PKI in etwa charakteristisch ist.

Der Nachweis des PKI auf indirektem Wege (S.32, 35, u. 44) ergab ebenfalls, daß etwa 20 % der Trypsinhemmung nicht auf den PKI zurückzuführen sind und dieser also zu 80 % im anionischen Proteinanteil enthalten war.

Er konnte erwartungsgemäß von Trypsin und Chymotrypsin nicht angegriffen werden. Auch eine Verdauung durch Pepsin im HCl-Milieu über mehrere Stunden fand nicht statt.

Untersuchung des basischen Proteinanteils (Lyophilisat 3):

Gewonnen wurden 1,2 g Festsubstanz aus 1 kg Pankreasgewebe.

Wiederum wurden 5 mg davon in 2 ml Aqua bidest. gelöst. Es ergab sich ein Gehalt von

45 TIE, 4,9 CIE; und 7,2 KIE / mg.

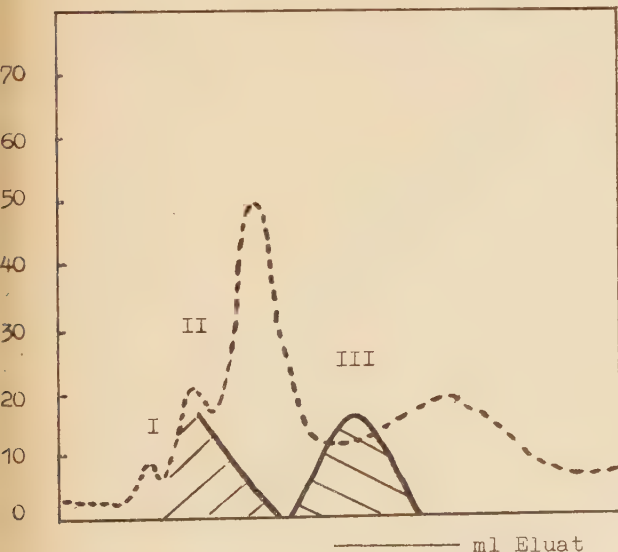
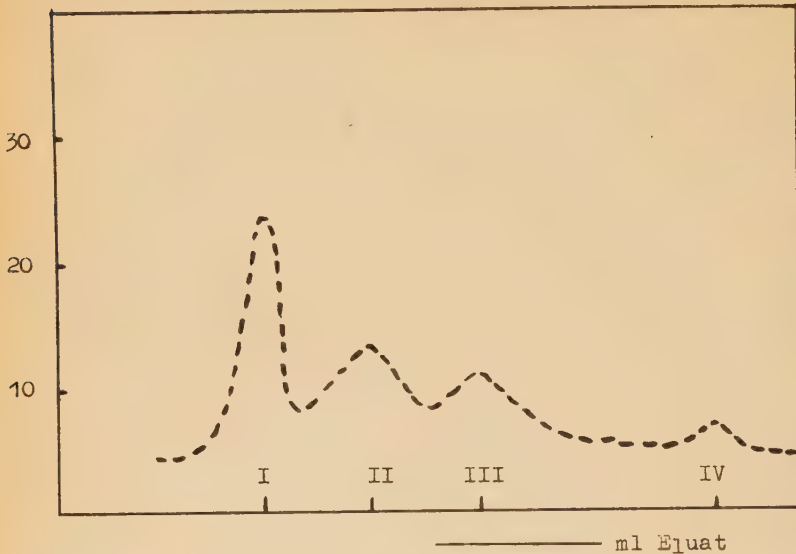


Abb. 14 :
Komplex-Abtrennung über
Sephadex G 50

Säule: 69 x 2 cm
TRAP-Puffer pH 7
0,1 m NaCl.
Aufgabe: 200 mg
Lyophilisat 3 (+),
6 mg Chymotrypsin
u. 2 mg γ -Globulin
in wenig Puffer.
I: γ -Globulin
II: PKI-Chymotrypsin-Komplex + aktives Chymotrypsin.
III: Trypsin-Inaktivator = TI.

Abb. 15: Bestimmung des Molekulargewichts des spezifischen Trypsin-Inaktivators durch Gelfiltration.



Sephadex G 50. Bedingungen wie in Abb. 14.

Aus dem bekannten Molekulargewicht und aus dem Zeitunterschied, mit dem die drei Proteine γ -Globulin (I), Chymotrypsinogen (II) und Cytochrom c (III) im Vergleich zum TI (IV) erscheinen, läßt sich das Molekulargewicht des Trypsin-Inaktivators zu etwa 7 000 bestimmen.

Das Verhältnis von CIE:TIE belief sich auf rund 1:10, das von CIE:KIE auf 1:1,47 (vergl. oben 1:1,63).

Der geringe Gehalt an CIE und KIE und die Hemmverhältnisse besagen, daß nur 10 - 20 % der Trypsinhemmung auf den PKI zurückzuführen sind. Bestätigt wurde dies wiederum durch den Indirekten Nachweis des PKI. (s.S. 32, 35, u. 44).

Präparative Trennung des Trypsin-Inaktivators TI vom PKI:

200 mg Lyophilisat 3 (+) (basische Proteine), die 9000 TIE und 980 CIE enthielten, wurden mit einem 6-fachen Überschuß

an Chymotrypsin (6 mg) und etwas γ -Globulin zur Markierung auf eine mit Puffer äquilibrierte Sephadex G 50 - Säule gegeben. Wie Abb. 14 zeigt, erscheint zuerst das γ -Globulin, dann der gebildete Chymotrypsin-PKI-Komplex mit überschüssigem Chymotrypsin und schließlich der TI. Dieser vermochte weder Chymotrypsin noch Kallikrein zu hemmen, denn der im Lyophilisat 3 (+) enthalten gewesene PKI hatte mit dem Chymotrypsin einen Komplex gebildet, der sich auf Grund seines höheren Molekulargewichtes vom TI, der offensichtlich nicht komplexgebunden war, abtrennte. Daß dies vollständig geschah, ist ein Beweis dafür, daß bei den angewendeten Konzentrationsverhältnissen nicht ein stabiler, sondern auch undissoziierter Komplex vorlag. Von den ^{nur}aufgegebenen 9 000 wurden 5 200 TIE wieder eluiert. 1 800 TIE entsprachen dem Verlust des PKI.

Der so gewonnene spezifische Trypsin-Inaktivator = TI erwies sich in Gegenwart von Chymotrypsin in seiner Hemmwirkung stabil. (Inkubation über 30 Min.). Auch eine Trypsinverdauung (temporäre Inaktivierung) des TI konnte im Verlauf von 3 Stunden nicht festgestellt werden. Die Inkubation mit Pepsin bei pH 1,5 ergab, daß 50 μ g Pepsin in 3 Stunden bei 20° einen Verlust von 8 TIE = 80 % bewirken. Nach 15 Min. beträgt der Verlust etwa 14 %. Bei 3 Min. langem Erhitzen auf 80° in 5 %iger Trichloressigsäure wurde der Inaktivator nicht denaturiert und seine Wirksamkeit nicht beeinträchtigt.

Die Ausbeute an PKI betrug 20 000 TIE / kg Pankreas, an TI 45 000 TIE / kg Pankreas. Da mit enteweißten Extrakten 500 000 TIE / kg ermittelt wurden, beträgt die Ausbeute an Gesamt-TIE etwa 18 %. (Mehrere 100 mg Lyophilisat gingen bei Vorversuchen verloren!).

D. Untersuchung von Pankreassekret.

1. Hundepankreassaft:

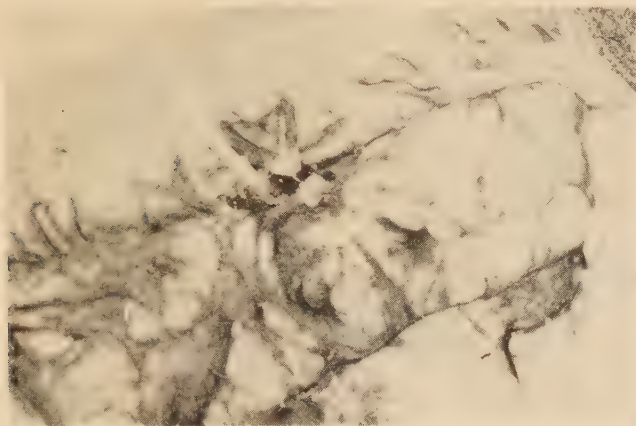
Bei Zusatz von 1 ml frisch gewonnenen Pankreassaftes zu 20 µg Chymotrypsin im Ansatz wurde keine Hemmung gefunden. Konzentriertere Lösungen aus einem Lyophilisat, sowie enteiweißte Extrakte zeigten das gleiche Verhalten: 30 - 50 TIE enthaltende Mengen hemmten weder die Proteolyse (Substrat: SUPHEPA) noch die Esterolyse (TEE) des Chymotrypsins.

2. Enteiweißter Fistelsaft vom Menschen, gewonnen nach Pankreatoduodenostomie, ergab keine Hemmung des Chymotrypsins.

3. Pankreassaft vom Jungrind:

Das Sekret wurde auf operativem Wege gewonnen: Das Tier wurde durch i.v.-Injektion von Pentotal in eine Ohrvene narkotisiert. Nach Venesektio, Anlegen einer Infusion und Tracheotomie zur Beherrschung der Narkose wurde der Oberbauch durch mediane Cauterisation eröffnet. Die in der Tiefe der Mägen liegende Duodenumschlinge wurde hervorluxiert und der Ductus pankreaticus gesichtet. In diesen wurde nach Anschlingen ein feiner Polyvinyltubus eingebunden. Das Pankreas sezernierte nicht spontan. Erst nachdem 75 E (Ivy-Einheiten) Sekretin i.v. injiziert worden waren, kam die Sekretion in Gang. (Sekretin regt auf humoralem Wege vor allem die Wasser- und Salzausschüttung an). Zunächst verursachten Gallebeimengungen eine leichte Grünfärbung, dann wurde das Sekret zusehends klarer. Auf diese Weise wurden etwa 25 ml in 20 Min. gewonnen. Nachdem mehrmals je 75 E Sekretin und "Cecekin"

Abb. 16: Das Operationsgebiet nach Anschlingen des Ductus pankreaticus und Einführen der Sonde.



injiziert worden waren, konnten in 1,5 Stunden weitere 50 ml erhalten werden. (Cecekin regt die Ausschüttung von Eiweißstoffen = Enzyme und Inaktivator an ³⁴⁾). Auch jetzt trat zunächst etwas Gallebeimengung auf. Insgesamt wurden etwa 70 ml Saft in 2 Stunden aufgefangen.

Der anfangs nach Sekretininjektion gewonnene Saft enthielt 16 TIE / ml und 2 CIE / ml. Das Sekret, das Sekretin und Cecekin-Injektion erhalten wurde, ergab einen Gehalt von 32,5 TIE und 0 CIE / ml bei direktem Test mit SUPHEPA, 2 CIE / ml bei indirektem Test. Die Kallikreinhemmung war äußerst gering. Aus dem folgenden geht hervor, daß es sich bei der geringen Chymotrypsin- bzw. Kallikreinhemmung wahrscheinlich um einen unspezifischen, durch Salz- oder Gallebeimengungen verursachten Effekt handelte.

Der Trypsinogengehalt betrug 0,82 mg / ml.

Ein Teil des nach Sekretin-Cecekin-Injektion gewonnenen Sekretes wurde 1:1 mit 6 %iger HClO_4 enteiweißt und der Überstand 3 Min. auf 60° erhitzt. Neutralisiert wurde mit 5 m K_2CO_3 -Lösung.

Der Extrakt enthielt 34 TIE, bezogen auf 1 ml Nativsaft, wies also weder eine merkliche Zunahme noch eine Abnahme an Inaktivator gegenüber dem nativen Frischsaft auf.

Eine Chymotrypsinhemmung war jetzt weder direkt mit SUPHEPA als Substrat, noch auf indirektem Wege (s.S. 32, 35, u. 44) nachzuweisen, ebensowenig eine Kallikreinhemmung.

Postmortal sofort herausgenommenes, homogenisiertes und enteiweißtes Pankreasgewebe vom gleichen Tier enthielt folgende Inaktivatormengen: pro g Feuchtgewebe:

300 TIE und 53 CIE.

Nur $1/3$ der TIE waren also auf PKI zurückzuführen, was u.U. gerade für das Jungrind charakteristisch sein dürfte. (Vergl. auch III. Diskussion).

Tabelle VI: Inaktivatoren für Proteinasen im Pankreas
von verschiedenen Säugern.

	TIE pro g F.gew. bzw. ml Frisch- saft	CIE pro g F.gew. bzw. ml Frisch- saft	KIE pro g F.gew. bzw. ml Frisch- saft	CIE:TIE	% TI
Mensch					
Homogenat	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
Enteiv.Extrakt	325-400	0	0	- - -	100
Frischsaft ^{+))}	28	0	0	- - -	100
Enteiv. Saft ^{+))}	"	0	0	- - -	100
Schwein					
Homogenat	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
Enteiv.Extr.	300-400	0		- - -	100
Frischsaft	30	0		- - -	100
Enteiv.Saft	"	0		- - -	100
Hund					
Homogenat	400	0	0	- - -	100
Enteiv.Extr.	300-400	0	0	- - -	100
Frischsaft	bis 120	0 ⁺⁺⁾	0	- - -	100
Enteiv.Saft	" "	0	0	- - -	100
Rind					
Homogenat ⁺⁺⁺⁾	330-440	0-90	bis 150 ^{o)}	bis 1 : 3,3	40 bis 100
Enteiv.Extr. ⁺⁺⁺⁾	410-600	82-180	bis 250 ^{o)}	1 : 5 bis 1 : 3,3	40 bis 60
Kalb					
Enteiv.Extr.	300-400	53-70	bis 105 ^{o)}	1 : 5,8	66
Frischsaft	65	(4)	(5)	- - -	100
Enteiv.Saft	68	0!	0!	- - -	100
Kaninchen					
Enteiv.Extr.	72-100	23-30	bis 45 ^{o)}	1 : 3,3	40

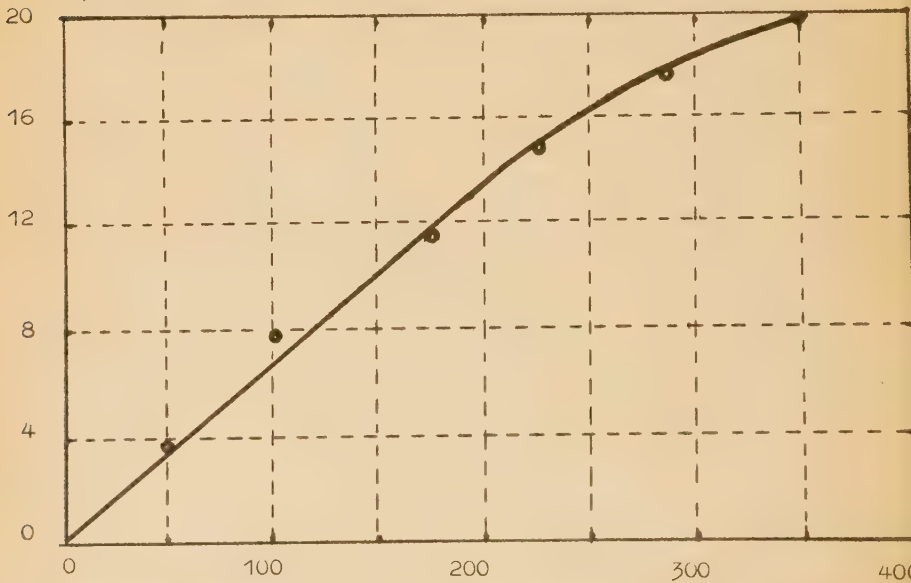
^{+))}: Fistelsaft. ⁺⁺⁾: Proteolysehemmung. ⁺⁺⁺⁾: Aus 4, bzw. 6 Versuchen ermittelt. ^{o)}: Dem PKI entsprechend errechnet.

E. Bestimmung der Chymotrypsin-Inaktivierung durch einen spezifischen Inhibitor aus der α_1 -Globulinfraktion des menschlichen Serums unter Verwendung von SUPHEPA als Substrat.

Für den von den Behringwerken zur Prüfung überlassenen hochmolekularen Inaktivator wurde eine Hemmung von 0,14 mg Chymotrypsin pro ml Reinsubstanz angegeben, gemessen an der Caseinverdauung nach Anson.

Nach den hier gemachten Untersuchungen vermochte der Inhibi-

Abb. 17 : Chymotrypsinhemmung bei Steigenden Mengen α_1 - "Antichymotrypsin".



Substrat: SUPHEPA, $1,72 \times 10^{-3}$ m. Puffer: 0,2 m TRAP pH 7,8

Ordinate: µg Chymotrypsin gehemmt / Ansatz $25^{\circ}, 2,6\%$

Abzissse: µg Reinsubstanz an Inhib./ Ansatz Aceton

tor Trypsin und Kallikrein nicht zu hemmen.

Die Hemmwirkung gegenüber Chymotrypsin wurde anhand des Substrats SUPHEFA getestet: 0,067 mg Chymotrypsin wurden pro mg Reinsubstanz gehemmt. Berechnet wurde dies aus der 50 %-igen Inaktivierung von 20 µg Chymotrypsin im Ansatz, wobei eine entsprechende Lösung des Inaktivators in Aqua bidest. verwandt wurde.

Aus Abb. 17 geht hervor, daß die Hemmung offenbar nicht stöchiometrisch und linear mit der Inaktivatorkonzentration ansteigend erfolgt: Wo die Inaktivatormenge den inkubierten 20 µg Chymotrypsin äquivalent wird, unterliegt der gebildete Enzyminhibitor-Enzym-Komplex einer geringen Dissoziation.

Setzt man eine Mol pro Mol erfolgende Hemmreaktion voraus, ergibt sich für den Inhibitor ein Molekulargewicht von 300 000; daß die Hemmwirkung in Gegenwart des Substrates SUPHEFA nur die Hälfte der anhand der Caseinverdauung ermittelten beträgt, soll an anderer Stelle versucht werden zu erklären.

III

D I S K U S S I O N .

Die bisher gebrauchten Verfahren zur Chymotrypsinbestimmung lieferten bei den durchgeführten Untersuchungen in Gegenwart roher Pankreasextrakte keine zuverlässigen und reproduzierbaren Ergebnisse. Es war deshalb nötig, neue Methoden zu entwickeln, die den gestellten Bedingungen genügten. Eine hier dargestellte neue Bestimmung der Esterolyse des Chymotrypsins mit TEE / ADH, die sich auch in eiweißhaltiger Lösung durchführen läßt, erfüllte jedoch nicht alle Forderungen.

Mit dem neuen Substrat SUPHEPA konnte eine Bestimmungsmethode ausgearbeitet werden, die sich in verschiedener Hinsicht als günstig erwiesen hat. Vor allem bei Bestimmungen, bei denen sich ein hoher Gehalt an Fremdeiweiß und aktivierbaren Enzymen nicht umgehen läßt (wässrige Homogenate), lieferte diese Methode genaue und reproduzierbare Ergebnisse.

Suphepa ist im Vergleich zu den Ester-, Amid-, und den Proteinsubstraten (Casein und Haemoglobin) relativ spezifisch für Chymotrypsin. Die Bestimmung zeichnet sich durch ihre einfache Handhabung und die geringen Fehlerquellen aus. Sie gewährt einen raschen Überblick und läßt sich mit der Trypsinbestimmung mit BAPA als Substrat gut kombinieren.

Wie schon eingangs erwähnt, fanden Grossmann und andere im Pankreas des Hundes und der Ratte einen Inaktivator, der nur das Trypsin zu hemmen vermochte. ²⁸⁾ Er besitzt andere Eigenschaften wie der von Kazal dargestellte Trypsin-Inhibitor aus Rinderpankreas (Tabelle I), der nur in sehr geringen Mengen gewonnen wurde.

Mit Hilfe der SUPHEPA-Methode zur Chymotrypsinbestimmung konnte hier erstmals sicher geklärt werden, daß im Pankreas des Menschen, des Hundes und des Schweines kein PKI enthalten ist, sondern nur ein spezifischer Trypsin-Inhibitor (TI) und beim Rind neben diesem zusätzlich der PKI vorliegt. Er kann dort vom Gesamttrypsin-Inaktivatorgehalt bis zu 60 % ausmachen. Das Rinderpankreas enthält bis zu 50 % mehr Gesamttrypsin-Inaktivator / g Gewebe, verglichen mit den Verhältnissen beim Menschen, Hund oder Schwein. Beim Kalb liegt der Trypsin-Inaktivatorgehalt niedriger und der Anteil des PKI beträgt nur 33 %. Da auch die Inaktivatorkonzentration im sezernierten Saft beim Kalb niedriger ist als beim Hund, dürfte beides ein Zeichen dafür sein, daß das Pankreas des Kalbes seine funktionelle Entwicklung noch nicht abgeschlossen hat.

Während im wässrigen Hundepankreas-Homogenat die gleiche Konzentration an Inaktivator vor und nach dem Enteiweißen gefunden wurde, enthielt der HClO_4 -Extrakt des Rinderpankreas bis zu 100 % mehr Inaktivator für Trypsin als der entsprechende Nativextrakt. Der Zuwachs ist vor allem auf den PKI zurückzuführen.

Diese Ergebnisse sind deshalb bereits gesichert, weil die exakte Abgrenzung des PKI vom TI in rohen Extrakten nicht nur durch die Bestimmung der Chymotrypsin- und Kallikrein-hemmung erfolgte, sondern der PKI-Anteil auch indirekt nachgewiesen wurde. Dies geschah durch Zugabe von überschüssigem α -Chymotrypsin und anschließender Bestimmung der restlichen Trypsinhemmung.

Daß die Inaktivatormengen pro g Gewebe von Extrakt zu Extrakt etwas differieren, erklärt sich zum Teil methodisch: beim Aufschließen durch Homogenisieren sind nie ganz gleiche Bedingungen gegeben. Beim Enteiweißen adsorbieren ausfallende Proteine bis zu 25 % des niedermolekularen Inaktivators. Der Inaktivatorgehalt dürfte aber auch je nach der Region des Pankreas, die gerade herausgenommen wurde, und je nach dem funktionellen Zustand, in dem sich das Pankreas beim Tode des Tieres befand, schwanken. Der Wassergehalt des Gewebes dürfte ebenfalls unterschiedlich sein. Die Ausbeute hängt auch davon ab, ob ein Inaktivator strukturgebunden ist oder frei im Cytoplasma vorliegt. Ist ersteres der Fall, sind die Aufarbeitungsbedingungen von entscheidender Bedeutung für die Konzentrationsverhältnisse im Extrakt.

Aus dem bisher Gesagten geht hervor, daß der TI für das Pankreas organspezifisch zu sein scheint.

Da der PKI beim Rind nicht nur im Pankreas, sondern auch in anderen Organen vorkommt, dürfte er eine Bedeutung haben, die sich nicht auf ein einziges, spezifisches Gewebe bezieht.

Es ist auch noch nicht zu sagen, ob nicht ein ähnlicher Inaktivator auch in anderen Organen als dem Pankreas bei Mensch, Hund und Schwein vorkommt. In der Submaxillaris des Hundes z. B. wurde ein Inaktivator gefunden, der Trypsin und Chymotrypsin, nicht aber das Kallikrein hemmt.⁷⁸⁾ Betrachtet man den PKI und verwandte Inaktivatoren unter einem solchen Gesichtspunkt, so könnte man sich diese als einen Schutz gegen die Freisetzung kreislaufaktiver und allergisierender Substanzen, (Kinine, Histamin) vorstellen: sie hemmen das Trypsin, das Kallikreinogen und Chymotrypsinogen zu aktivieren vermag, sie hemmen Kallikrein und Chymotrypsin, weil möglicherweise diese auch anderweitig aktiviert werden können und dann über die Freisetzung von Kallidin bzw. Histamin eine schädliche Wirkung auf den Kreislauf, die Reaktionsbereitschaft des Gewebes und auf die Elemente der glatten Muskulatur überhaupt ausüben.

Im Rinderpankreas können durch den gleichzeitig vorhandenen Inaktivator nur 8 - 14 % des aktivierbaren Trypsins und nur 2,5 % des freilegbaren Chymotrypsins abgefangen werden. Immerhin dürfte in der Zelle eine ständige Neusynthese auch der Inaktivatoren erfolgen, die auf ein Konstantbleiben der Konzentrationsverhältnisse hinzielt. Denn das der PKI und der TI keine Kunstprodukte sind, etwa Bruchstücke größerer Eiweißmoleküle, konnte hier gesichert werden: die beiden Inaktivatoren waren auch im wässrigen Nativhomogenat in etwa gleichen Mengen nachzuweisen.

Die präparative Trennung ist der endgültige Beweis für die Gegenwart zweier Inaktivatoren (PKI und TI) im Rinderpankreas. Die Trennung über Ionenaustauschersäulen hat sich als Umweg erwiesen, sobald feststand, daß der PKI mit dem Chymotrypsin einen stabilen Komplex bildet. Zwar dissoziiert dieser bei pH 7,8 schwach, wenn die Reaktion zwischen äquivalenten Mengen an Enzym und an Inaktivator stattfindet, jedoch läßt sich durch einen Überschuß an Chymotrypsin das Gleichgewicht so beeinflussen, daß daneben nur der Komplex vorliegt. Rückblickend ergibt sich also, daß das einfachste Trennungs- bzw. Isolierungsverfahren folgendes ist: der enteweißte Extrakt wird eingedampft oder lyophilisiert, entsalzt, mit einem Überschuß an Chymotrypsin über Sephadex G 50 gegeben und so der niedermolekulare TI vom Chymotrypsin-PKI-Komplex getrennt. Der Komplex kann bei pH 2, entsprechend dem Verfahren das von Kunitz und Northrop für den Trypsin-PKI-Komplex angewandt wurde, wieder quantitativ in seine Bestandteile getrennt werden.

Da die Aminosäuren-Zusammensetzung und die Eigenschaften des PKI bekannt sind⁴³⁾, wurde hier nur auf eine weitere Reinigung des TI und die Darstellung seines Verhaltens Wert gelegt. Im Gegensatz zu dem Kazal'schen Trypsin-Inhibitor zeigt der hier isolierte TI keine temporäre Inaktivierung, wird also von Trypsin (und auch von Chymotrypsin) nicht verdaut und ist mit 5 %iger Trichloressigsäure nicht fällbar. Er besitzt also ähnliche Eigenschaf-

ten wie der von Grossmann beschriebene. (s. Tabelle I). Von dem Kazal'schen Inaktivator ist er eindeutig verschieden. Ob diesem im Pankreas überhaupt eine physiologische Bedeutung zukommt muß um so fraglicher erscheinen, als von Kazal nur 300 TIE pro kg Pankreas gewonnen wurden. Hier konnten etwa 35 000 TIE pro kg Pankreas an weitgehend gereinigtem TI gewonnen werden und 20 000 TIE an weniger reinem PKI (Kunitz: 5700 TIE pro kg). Das der PKI und der TI sich in freiem Zustand mit Ionenaustauschersäulen weitgehend trennen lassen, nicht dagegen über Sephadex, ist ein Hinweis auf Ladungsverschiedenheiten bzw. auf verschiedene Aminosäuren-Zusammensetzungen bei ähnlichen Molekulargewichten. Das der PKI bei pH 7 als Anion durch CM-Cellulose läuft, obwohl sein IEP bei pH 10 liegt, dürfte auf eine anscheinend spezifische Assoziation mit sauren Proteinen zurückzuführen sein, deren Vorhandensein sicher weitgehend von den entsprechenden Aufarbeitungsbedingungen abhängt.

Die Tatsache, daß von den zwei Inaktivatoren des Rinderpankreas nur der TI und dieser auch beim Menschen, Hund und Schwein ⁶⁸⁾ sezerniert wird, weist darauf hin, daß es sich hier um ein allgemeines Prinzip handelt. Auf Grund der gleichen Eigenschaften der beim Hund ²⁸⁾, Schwein ⁺), hier beim Rind und auch beim Menschen ³³⁾ dargestellten Trypsin-Inhibitoren darf man auch auf einen ähnlichen Peptidaufbau schließen.

⁺) Private Mitteilung von H. Fritz und E. Werle.

Der Anstieg der Inaktivatorkonzentration im Pankreassekret des Kalbes nach iv.-Injektion von Cecekin, das vor allem die Enzymausschüttung anregt, läßt vermuten, daß der TI nicht nur gemeinsam mit den Enzymen sezerniert wird, sondern auch in enger Beziehung zu den Zymogengranula steht, die die Enzymvorstufen enthalten. Aus dem Trypsinogengehalt und den TIE pro ml ergab sich für das Kalb, daß nur etwa 4 % des aktivierbaren Trypsins durch den TI im Saft abgefangen werden können. Die Frage, ob der TI einen Schutz gegen in geringen Mengen aktiv werdendes Trypsin im extrazellulären Bereich darstellt, bleibt offen. Man muß immerhin einräumen, daß der TI unter physiologischen Bedingungen einer solchen Schutzfunktion genügen dürfte, denn er würde dann vor allem verhindern, daß andere Proteasen durch wenig freies Trypsin im Bereich des Pankreasgangsystems aktiviert würden, die dann ihrerseits schwerwiegende, unphysiologische Verhältnisse verursachen können.

Der hier getestete, reine Chymotrypsin-Inaktivator aus der α_1 -Globulinfraktion von menschlichem Serum, verursachte wie der PKI keine stöchiometrische, Mol pro Mol erfolgende Hemmung. Die Hemmung war substratabhängig: beim Test mit SUPHEPA als Substrat war sie nur halb so groß wie von der Firma für die Caseinverdauung angegeben. Ebenso wie beim PKI läßt sich wegen der schwachen Dissoziation am Äquivalenzpunkt (Abb. 17) vermuten, daß die Hemmung kompetitiv erfolgt.

Für den Inaktivator errechnet sich aus der Hemmung der Caseinverdauung ein MG von 150 000. Aus der Hemmung der SUPHEPA-Verseifung ein MG von 300 000.

Die Substratabhängigkeit der Inaktivierung dürfte in der Weise zu erklären sein, daß die Inaktivierung nicht nur von der Molekülgröße des Inhibitors, sondern auch von der Tertiärstruktur sowohl des Enzyms als auch des Inaktivators abhängt. Wenn verschiedene Substratmoleküle am Enzymmolekül verschiedene Anlagerungsmöglichkeiten haben, erklärt sich auch eine verschieden starke Hemmung von Esterolyse und Proteolyse durch den gleichen Inaktivator: der eingangs erwähnte Chymotrypsin-Inhibitor aus Kartoffelextrakten ⁴⁹⁾ hemmt zwar die Caseinverdauung durch Trypsin, dessen esterolytische Aktivität aber gar nicht. Der PKI hemmt, wie hier gezeigt wurde, die Esterolyse von TEE viermal so stark wie die "Proteolyse" von SUPHEPA durch Chymotrypsin.

Eine eingehendere Kenntnis dieser substratabhängigen Inaktivierungsformen würde sicher auch über den Mechanismus der Enzymwirkung, den Aufbau und die Eigenschaften der aktiven Zentren, weitere Aufschlüsse bringen. Klären würde sich so auch die offene Frage, warum die Hemmung des Trypsins Mol pro Mol Inaktivator erfolgt, die des Chymotrypsins dagegen etwa zwei Mol PKI pro Mol Chymotrypsin erfordert. (Proteolysehemmung).

Nagel und Willig²¹⁾ stellten mit Azocasein eine "proteolytische Restaktivität" im Rattenpankreas-Homogenat fest, die durch Trypsin-Chymotrypsin-Kallikrein-Inaktivatoren nicht zu hemmen war. Sie fanden zugleich auch eine Aktivität gegenüber SUPHEPA, die im pankreatitischen Begleitascites beträchtlich war und nicht auf Chymotrypsin zurückgeführt werden konnte. Daraus daß diese Aktivität gegenüber SUPHEPA aber mit Serum gehemmt werden konnte, schlossen sie, daß es sich um eine Pankreaselastase handele.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Spontanaktivitäten im Pankreashomogenat des Rindes gegenüber BAPA und SUPHEPA gefunden, die nicht von Trypsin bzw. Chymotrypsin verursacht waren. Da die Spontanaktivität gegenüber SUPHEPA eines Schweinepankreashomogenates bei pH 9 zum Stillstand gebracht werden konnte, liegt die Vermutung nahe, daß sie durch Kathepsine hervorgerufen war. Dies ist um so wahrscheinlicher, als eine reine Pankreaselastase SUPHEPA nicht zu spalten vermochte. Auch waren die Aktivitäten in besonders klarem Homogenat (Versuch 3 Tabelle IV) nicht oder nur gering. Dies ist ein Hinweis dafür, daß es sich möglicherweise um strukturgebundene Enzyme, etwa Kathepsine aus Zellmikrosomen, handelt, die durch die Aufarbeitung in unterschiedlichem Maße zerstört werden. Darauf lassen sich auch die unterschiedlichen Spontanaktivitäten der Homogenate zurückführen. Es ist möglich, daß die von Nagel und Willig festgestellte SUPHEPA-Spaltung auch durch ein katheptisches Enzym verursacht war, das gerade auf Grund seiner Chymotrypsinähnlichkeit durch Serum gehemmt wird, was wiederum auf sein ubiquitäres Vorkommen schließen ließe.

Eine Chymotrypsinogen-Aktivierung im Rinderhomogenat wurde hier immer dann beobachtet, wenn eine Spontanaktivität des Homogenats gegenüber BAPA bestand oder sich entwickelte. Es ist nicht ausgeschlossen, daß ein solches Trypsinähnliches Enzym wie das welches eine BAPA-Hydrolyse bewirkte, auch Chymotrypsinogen zu aktivieren vermag. Denn es konnte weder zu irgendeinem Zeitpunkt aktives Trypsin, hemmbar mit PKI, im Homogenat festgestellt werden, noch wurde in einem Versuch während der Umwandlung von Trypsinogen in die Trypsin-TI-Verbindung Chymotrypsinogen aktiviert.

Obwohl der PKI zum Trypsin eine wesentlich größere Affinität hat als der TI, muß sein Verschwinden im Nativhomogenat im Verlaufe von Stunden bzw. sein Geringerwerden vor allem auf die Bindung an aktives Chymotrypsin zurückgeführt werden. Zwar weist die Abnahme auch des TI-Gehalts auf eine langsam und gering erfolgende Trypsin-Aktivierung hin, jedoch stünde diese in keinem Verhältnis zu der in mehreren Versuchen rasch erfolgten Freisetzung von Chymotrypsin. Daß die Inaktivatoren TI und PKI nicht zerstört werden, geht daraus hervor, daß sie nach Enteiweißen und Erhitzen in jedem Falle darzustellen sind. Nach den hier gemachten Beobachtungen erscheint es von untergeordneter Bedeutung, daß nur wenig TI einer großen Menge Trypsinogen gegenüber steht, denn offenbar wird Trypsin in größerem Umfange gar nicht aktiv. Obwohl sich in vitro Beobachtungen nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse in vivo übertragen lassen, sei hier nochmals darauf hingewiesen, daß der TI seine Aufgabe, eine effektive Aktivierung von Trypsin zu verhindern, gerecht wird und über lange Zeit kein aktives Enzym anfällt.

Trotzdem kann damit nicht ausgeschlossen werden, daß sich dieser "Begleitschutz" des Trypsins unter pathologischen Verhältnissen im Pankreasgangsystem, wie sie eingangs geschildert wurden, als insuffizient erweist.

Es muß offen bleiben, ob das Fehlen des PKI im menschlichen Pankreasgewebe dieses für eine Fermententgleisung besonders anfällig macht, d. h. ob etwa unphysiologisch aktiviertes Chymotrypsinogen und andere Proteasen zu autodigestiven Vorgängen führen. Den Beobachtungen mit Rinderpankreas-Homogenat nach erscheint dies möglich, jedoch ist in vivo eine homogene Durchmischung von Gewebs- und Zellbestandteilen auch bei entzündlichen und nekrotischen Affekten nicht gegeben. Immerhin könnten die dabei bestehenden pathologischen Verhältnisse zu osmotischen-, pH-, und anderen Veränderungen führen, die in der Zelle eine Freisetzung sonst strukturgebundener Elemente und Enzyme herbeiführen. So wird z. B. zur Zeit diskutiert, ob die sogenannten Lysosomen, die eine Reihe von Hydrolasen, darunter Kathepsine und Kollagenase, enthalten, bei einer Veränderung ihrer Membran diese Enzyme nach außen in aktiver Form übertreten lassen.

Die positive klinische Wirksamkeit des PKI in Form des "Trasylols" könnte durchaus weniger auf seiner Trypsin- als auf seiner Chymotrypsin- und Kallikreinhemmenden Fähigkeit beruhen. Tierexperimente, die die klinischen Erfahrungen nicht bestätigen, beweisen noch nicht, daß das "Trasylol" auf die Pankreatitis des Menschen keinen Einfluß hat; denn wie hier gezeigt werden konnte, besitzen die hochentwickelten Säugetierorganismen durchaus gemeinsame Prinzipien, zeigen auf der

anderen Seite jedoch Unterschiede, die Schlüsse von einem Organismus auf den anderen nur mit großer Vorsicht zulassen.

Die Ansichten über den spezifischen Verlauf der Pankreatitis dürften so lange hypothetisch bleiben, bis es durch Partikelfraktionierung und histochemische Untersuchungen glückt, Zymogene, Inaktivatoren und zellspezifische Pro-teasen zu lokalisieren.

Neue Gesichtspunkte dürften sich auch ergeben, wenn nicht nur der PKI, sondern auch der Submaxillaris- und der spezifische Trypsin-Inhibitor experimentell zur Anwendung gelangen und somit eine Abgrenzung der verschiedenen Wirkungsmöglichkeiten von Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein möglich ist.

IV

Z U S A M M E N F A S S U N G .

1. Ältere und neuere Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Chymotrypsin haben sich für die Messung der Chymotrypsin-Inaktivierung durch Pankreashomogenate und -Extrakte als nicht geeignet erwiesen.
2. Mit dem neuen Substrat SUPHEPA wurde in der vorliegenden Arbeit eine handliche und genaue Methode zur Bestimmung von Chymotrypsin bzw. Chymotrypsin-Inaktivator auch in Gegenwart von sehr viel Fremdeiweiß und Enzymvorstufen ausgearbeitet.
3. Der Kunitz'sche Pankreas-Inaktivator und der Kallikreininaktivator aus Rinderlunge hemmen Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein im Verhältnis 1,85 : 1 : 1,7. Sie haben sich auch hier in ihrem Hemmverhalten als identisch erwiesen.
4. Im Pankreashomogenat bzw. Perchlorsäureextrakt von Mensch, Hund und Schwein findet sich etwa eine gleiche Konzentration eines spezifischen Trypsin-Inaktivators, jedoch keine Hemmung von Chymotrypsin und Kallikrein. Dieser Trypsin-Inaktivator ist niedermolekular. Er wurde näher charakterisiert. Im Rinderpankreas fand sich neben dem spezifischen Trypsin-Inaktivator der polyvalente Pankreas-Kallikrein-Inaktivator in gleicher Menge. Pankreasextrakte vom Kaninchen enthielten einen Chymotrypsin-Inaktivator.

5. Die Untersuchung der Verhältnisse am Pankreas eines Jungrindes zeigte, daß sich im Pankreashomogenat neben dem polyvalenten Kunitz'schen Inaktivator auch der spezifische Trypsin-Inhibitor nachweisen läßt, jedoch nur letzterer an den Saft abgegeben wird. Ganz entsprechend wurde auch im Hundepankreas-Sekret und im Fistelsaft des Menschen nur dieser festgestellt.

6. Der Kunitz'sche Pankreas-Kallikrein-Inaktivator und der Trypsin-Inaktivator wurden aus Rinderpankreasextrakt angereichert und präparativ voneinander getrennt. Dies geschah mit Hilfe säulenchromatographischer Verfahren.

7. Das Nativpankreashomogenat des Rindes zeigte eine Spontanaktivität gegenüber BAPA und SUPHEPA (Testsubstrate), die nicht auf Trypsin bzw. Chymotrypsin zurückzuführen war. Eine relativ rasche, nicht durch Trypsin verursachte Chymotrypsinogenaktivierung wurde beobachtet.

8. Die spezifische Hemmkapazität eines hochmolekularen Chymotrypsin-Inaktivators aus der α_1 -Globulinfraktion des menschlichen Serums (Behring-Werke), wurde mit Hilfe von SUPHEPA als Substrat bestimmt: 0,067 mg Enzym wurden pro mg Reinsubstanz gehemmt.

V

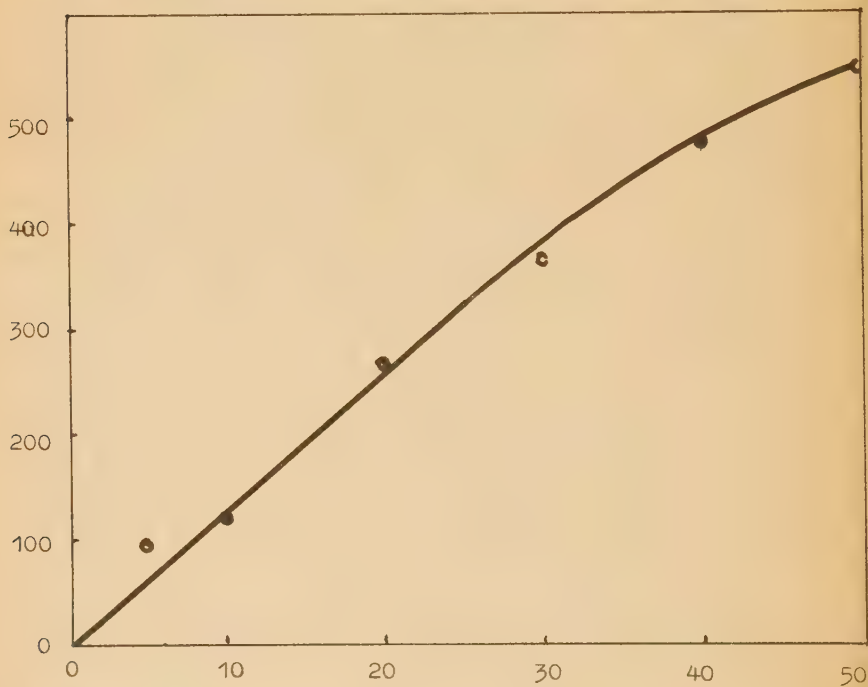
A N H A N G .

Bedingungen der Chymotrypsinbestimmungsmethoden so weit sie in Teil II nicht beschrieben wurden.

1. Bestimmung mit Harnstoff-denaturiertem Haemoglobin:

Lösungen: 0,5 m Phosphat-Puffer pH 7,0.

Abb. 18 : Chymotrypsinbestimmung nach Green und Work.



Eichkurve.

Ordinate: Extinktion x 10⁺³ gemessen gegen Puffer.

Wellenlänge 580 mμ.

Abszisse: μg Chymotrypsin / Ansatz . Bedingungen wie im Text.

Substratbereitung: 4,4 g Haemoglobin und 72 g Harnstoff werden in 162 ml Aqua bidest. gelöst und 30 Min. im Wasserbad bei 25° belassen. Danach werden nochmals 8 g Harnstoff und zugleich 16 ml 1 n NaOH zugesetzt. 20 ml 5 %-ige CaCl_2 -Lösung wird hinzugegeben, auf pH 7,6 eingestellt und auf 200 ml aufgefüllt.

Farbreagenz: Phenolreagenz nach Folin und Ciocalteu wird 1:2 verdünnt. Chymotrypsinlösung in 0,0025 n HCl oder in 0,05 m CaCl_2 -Pufferlösung. Die Extinktion wird bei 580 m μ gegen Puffer bestimmt.

Ansätze: Jede Probe wird doppelt in Schliffstopfengläsern ange-
setzt. Auf 2 ml Ansatzvolumen werden Puffer, Chymotrypsin- und
Testlösung verteilt und bei Zimmertemperatur 5 Min. vorinkubiert.
Die Doppelwerte werden sofort mit 10 ml TCE (5-%-ig) versetzt.
Dann werden alle Proben mit 5 ml Substratlösung sorgfältig
geschüttelt und 30 Min. bei 27° im Wasserbad deponiert.

Danach werden auch die Hauptwerte mit 10 ml TCE abgestoppt
und bei Zimmertemperatur 10 Min. stehen gelassen. Nach dem Fil-
trieren werden 5 ml des Filtrats mit 10 ml 0,5 n NaOH versetzt
und anschließend mit 3 ml Phenolreagenzlösung geschüttelt. Die
Färbung ist von der 2. bis 10. Min. nach Entwicklung konstant.
Die Extinktionsbestimmung erfolgt gegen Puffer. Es ist erforder-
lich, einen Blindwert ohne Chymotrypsin-Zusatz parallel laufen
zu lassen. Die endgültige Extinktion wird ermittelt, indem man
den zu Beginn bereits mit TCE gestoppten Doppelwert vom Haupt-
wert abzieht.

Bestimmung mit Benzoyl-phenylalanin- β -naphthylester:

Lösungen: 0,1 m Veronal-Puffer (Na-diaethylbarbiturat) pH 7,3
oder 0,2 m TRIS. Substratbereitung: 2 mg / ml Aceton als Stamm-
lösung. Kurz bevor die Proben mit dem Substrat versetzt werden
wird dieses aus der Stammlösung zubereitet: 5 ml der acetonischen
Lösung werden unter sorgfältigem Rühren mit 95 ml methanolischem
Puffer versetzt. Farbreagenz: 4 mg Echtblausalz / ml Aqua bidest.
Chymotrypsin-Lösung wie Oben mit 0,0025 n HCl.

Ansätze: Puffer, Test- und Chymotrypsinlösung werden auf 2 ml
Ansatzvolumen im Schliffstopfenglas verteilt. Ein Blindwert
enthält nur Puffer und Testlösung. Vergleichs- und Eichwerte
nur Puffer und Chymotrypsin.

5 Min. wird bei 25° vorinkubiert, dann mit 5 ml kurz zuvor bereiteter Substratlösung versetzt und 45 Min. bei 4° belassen. Dann wird mit 1 ml Echtblausalzlös. geschüttelt und die Reaktion nach 3 Min. mit 5 ml 20 %iger TCE beendet. Nach sorgfältigem Schütteln wird der Farbstoff mit 10 ml Essigsäure-aethylester extrahiert. Abdekantiert wird nach Schütteln und Zentrifugieren. Gegen Essigsäure-aethylester wird bei 540 m μ abgelesen.

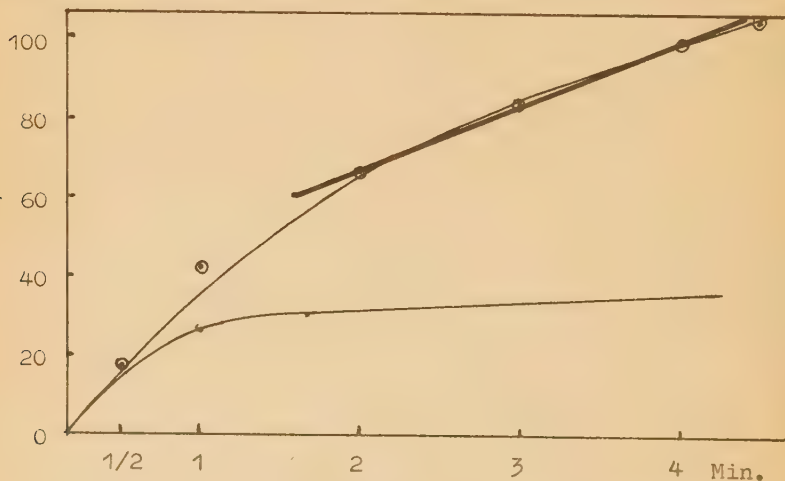
Bestimmung mit N-Carbobenzoxyl-L-Tyrosin-p-nitrophenylester:

Lösungen: 0,05 m TRIS-Puffer pH 7,8 mit 0,1 m CaCl_2 .

Substrat: 5×10^{-4} n Lösung: 21,8 mg in 60 ml Aceton und mit Aqua bidest. ad 100 ml. Chymotrypsinlösung: 10 mg in 10 ml 0,0025 n HCl = Stammlösung. 0,05 ml Stammlösung ad 100 ml = Chymotrypsintestlösung. Bestimmung der Extinktionsdifferenz pro Zeiteinheit bei 25° und 405 m μ Wellenlänge.

Ansätze: Puffer. Test. und Chymotrypsinlösung ad 2,5 ml / Ansatz. Dieser wird 5 Min. vorinkubiert und anschließend mit 0,5 ml Substratlös. versetzt. Ablesen gegen Leerwert von der 2. bis 3. Min.

Abb. 19 : Enzymat. Hydrolyse des N-CBZ-Tyr-p-nitrophenylesters.



Extinktionszunahme von 20 μg Chymotrypsin enthaltendem Ansatz (obere Kurve) und einem Leeransatz (untere Kurve) in Abhängigkeit von der Zeit. Bedingungen wie im Text.

Bestimmung mit L-Tyrosinaethylester:

Lösungen: TRIS-Puffer 0,2 m , pH 7,0. Substrat: L-Tyrosin-ethylester 0,002 m. L-Tyrosin 0,002 m mit 0,02 m CaCl_2 .

Chymotrypsin in 0,0025 n HCl-Lösung.

Gemessen wird mit dem Zeissphotometer bei 234 m μ und einer Spaltbreite von 0,4 bei einer Temperatur von 25 $^{\circ}$. Verwendet werden Quarzküvetten 1 cm.

Zusätze: Auf 1,5 ml Ansatzvolumen werden mindestens 0,3 ml Puffer, Chymotrypsinlösung und Testlösung (enteiweißter Extrakt) verteilt und 5 Min. vorinkubiert.

Nach Zugabe von 1,5 ml Substratlösung und gutem Mischen wird nach 5 Min. gegen die gleiche Probe mit L-Tyrosin abgelesen. Wenn die Meßgenauigkeit erlaubt ist eine kürzere Ableszeit zu empfehlen.

VI

L I T E R A T U R N A C H W E I S .

1. Hess, W.: Die Erkrankungen der Gallenwege und des Pankreas,
Stuttgart 1961, Thieme-Verlag.
2. Hansky, J. u. Janowitz, H.: Gastroenterology, Vol. 46, Nr. 2
3. Eisenhardt, R., Hartwell, G., Kubista, T., Himel, C.:
Fed. Proc. 20, 252, 1961
4. Becker, V.: Tryptische Pankreasitis und tryptische Nekrosen
Deutsch. Med. Wschr. 89, 671 (1964)
5. Becker, V.: Wesen und Ursachen der tryptischen Pankreatitis
Internist, 2, 366 (1961)
6. Schön, H., Henning, N.: Med. Exp. (Basel) 8, 83 (1963)
7. Kraut, H., Frey, E. K., Werle, E.: Über die Inaktivierung des
Kallikreins. Zschr. Physiol. Chemie 192, 1, (1930)
8. Werle, E.: Über die Inaktivierung des Kallikreins.
Biochem. Z. 273, 290, (1934)
9. Kraut, N., Bhargava, N.: Hoppe Sailer's Zschr. F. Phys. Chemie
Versuche zur Isolierung des Kallikreininaktivators
334, 230, (1963)
10. Werle, E., Maier, L. u. Ringelmann, E.: Hemmung von Proteinase
durch Kallikreininaktivatoren. Nat. wscrh., 39, 14 (1962)
11. Werle, E., Tauber, K., Hartenbach, W. u. Forell, M.: Zur Frage der
Therapie der Pankreatitis. Münch. Med. Wschr. 100, 126 (1958)
12. Vogel, W. u. Götz, F.: Die Behandlung der akuten Pankreatitis
Arzneitherapie, 1, 29, (1962)
13. Werle, E.: Biochemische Bemerkungen zur Therapie mit Kallikrein
und Kallikreininaktivatoren. Langenbecks Archiv klin.
Chir. 303, 5, (1963)
14. Asang, E.: Langenbecks Arch. klin. Chir. 293, 645, (1960)
15. " " " " " 294, 83, "
16. " " " " " " , 305, "
17. Kirsch, J.: Heilung einer akuten, traumatischen Pankreasnekrose
mit dem Kallikreininaktivator Trasylol. Med. Welt, 51, 27 (1956)
18. Schön, H., Hennig, N.: Klin. Wschr. 41, 201, (1963)
19. " " " " " 40, 612, (").

20. Bencosme, S. u. Craston, D.: Lab. Invest. , 7, 201, (1958)
21. Nagel, u. Willig, : Klin. Wschr. 42, 400, (1964)
22. " " : Naturwissenschaften, 51, 115, (1964)
23. Hosie, R. T. u. S. E. Ziffren: The relationship of collagenase to pankreatitis. Surgery, 40 185 (1956)
24. Doerr, W., V. Becker u. D. Neurbert: Methodischer Beitrag zum Hypoxieproblem. Naturwissenschaften, 43, 424 (1956)
25. Becker, V., W. Wilde: Pankreasschäden durch Trypsinin vitro
Klin. Wschr. 41, 73 (1963)
26. Kunitz, N. and I. Nrothrop: Journ. Gen. Physiol. 19, 991 (1936)
27. Kazal, : Am. Soc. 70, 3034 (1948)
28. Grossmann, M. J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 99, 304 (1958)
29. Kalser, M. H. and M. J. Grossmann: Fed. Proc. 29, 36
30. " " Gastroenterology 22
31. Negulescu, P., H. A. Harper, J. T. Crane, L. Goldman
Amer. J. Surgery, 102, 196
32. Schön, H., K. Heinkel, N. Henning: Klin. Wschr. 41, 612 (1963)
33. Haverback, B. J., B. Dyce, H. Bundy, H. A. Edmonson: Trypsin, trypsinogen and trypsin-inhibitor in human pancreatic juice.
Amer. J. Med. 29, 424 (1960)
34. Forell, M. M., H. Stahlheber: Klin. Wschr. 42, 675, (1964)
35. Werle, E. und W. Appel: Naturwissenschaften 45, 60 (1958)
36. Astrup, T. and A. Stage: Acta Chem. Scand. 10, 617, (1956)
37. Werle, E., W. Appel u. E. Happ: Maunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 234, 364 (1958)
38. Feng Chi Wu and M. Laskowski: J. Biol. Chem. 235, 1690 (1960)
39. Neurath, H. and Kenneth Bailey: The Proteins. Vol. II, Part B,
S. 1160
40. Green, N. M. : Proteinaseinhibitoren aus Ascaris lumbricoides.
Biochem. J., 66, 412, (1957)
41. Feensky, R. E., F. C. Stevens, M. H. Yuch and D. H. Osuga:
Comparative biochemistry of trypsin and chymotrypsin-inhibitors from avian egg whites. Fed. Proc. 21, 232, (1962)
42. Rhodes, M. B., N. Bennett, R. A. Feeney: J. Biol. Chem. 235, 1686 (1960)
43. Kassell, B., M. Radicevic, S. Berlow, R. J. Peanasky and M. Laskowski.
J. Biol. Chem. 238, 3274, (1963)
44. Kassell, B. and M. Laskowski: J. of Biol. Chem. 219, 203, (1956)

45. Walford, R.L. and Kickhöfen, B.: Arch. of Bioch. and Biophys.
98, 191 (1962)
46. Loeven, W.A. : Chem. Abstr. 56, 15993 (1962)
47. Lowell, B., M. Greenbaum and A. Hirschowitz: Fed. Proc. 547, 921
48. Feng Chi Wu and M. Laskowski: J. biol. Chem. 213, 609 (1955)
49. Ryan, C.A. and A.K. Balls : Chem. Abstr. 85, 4773, (1962)
50. Peansky, R.J.: Fed. Proc. 22 , 146, (1963)
51. Austen, J.F. u. W.E. Bocklehurst: J. Exper. Med. 113, 521 (1961)
52. Oswald, W.: Chymotrypsinhemmer in der allgemeinen Praxis.
Zschr. Ges. Inn. Med. 17 , 301, (1962)
53. Hureau, J., H. Audhioui, P. Vayre et E. Vairel:
54. Erlanger, B.F. and F. Edel: Biochemistry, 3 , 346 (1964)
55. Schonbaum, G.R., B. Zerner and M.L. Bender: J. Biol. Chem.
236 , 2930 (1961)
56. Anson, M.L. : J. gen. Physiol.: 22, 79 (1939)
57. Green, N.M. and E. Work: Biochem. J. 54, 257, (1953)
58. Ravin , Bernstein Seligman : J. Biol. Chem. 208, 1 (1954)
59. Schön, H., B. Bässler u. N. Henning: Klin. Wschr. 39, 217 (1961)
60. Guilbault, G.G. and P.N. Kramer: Analytical Chem. 36, 409 (1964)
61. Martin, C.J., J. Golubow., A.E. Axelrod: Biochim. Biophys. Acta
27, 430 (1959)
62. Schwert, G.W. u. Y. Takenaka: Biochim. Biophys. Acta 16, 570 (1955)
63. Trautschold, I., E. Werle: Hoppe Sailer's Zschr. f. Phys. Chem.
325, 48 (1961)
64. Tuppy, H., U. Wiesbauer und E. Wintersberger: Zschr. f. Phys. Chem.
329, 278 (1962)
65. Nassell, B. and M. Radicevic: Fed. Proc. 22, 529 (1963)
66. Scevola, M.E., M. Franchini and A. De Barbieri: Boll. Soc.
Ital. Sper. 38, 1771 (1962)
67. Trautschold, I., E. Werle, H. Haendle und H. Sebening:
Hoppe Sailer's Zschr. f. Phys. Chem. 332, 328 (1963)
68. Werle, E., I. Trautschold, H. Sebening, H. Fritz und M. Hutzel:
Sonderdruck. Verh. d. Dtsch. Ges. f. Inn. Med.

Lebenslauf.

Am 17. September 1941 wurde ich als Sohn des Gartengestalters Helmut Woitinas und seiner Ehefrau Erna, geb. Herfort, in Breslau geboren.

In den ersten Jahren nach 1945 fand sich meine Familie nach einer Flucht voller Wirrnisse in Bad Wörishofen / Bayern wieder ein. Dort besuchte ich die Volksschule und legte die Aufnahmeprüfung für das Gymnasium Kaufbeuren ab.

Nach zweimaligem Aufenthalt in der Schweiz und einem vorübergehenden in München, bedingt durch die schwierigen wirtschaftlichen Verhältnisse meiner Familie, trat ich 1953 in die Waldorfschule Stuttgart, Uhlandshöhe ein, die mein Vater für pädagogisch besonders wertvoll hielt.

Dort bestand ich im März 1960 die Reifeprüfung. Mein vorklinisches Medizinstudium absolvierte ich in Tübingen und bestand im März 1963 die ärztliche Vorprüfung mit sehr gut.

Anschließend immatrikulierte ich mich für das klinische Studium an der Universität München.

Seit April 1964 bin ich mit meiner Ehefrau Claudia Woitinas, geb. Hannsmann, verheiratet und in München wohnhaft.

Ich beabsichtige im Frühjahr 1966 die ärztliche Prüfung abzulegen.



